

SÉRIE A, n° 581

N° D'ORDRE :

1311

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Maurice JAVILLIER

PHARMACIEN SUPÉRIEUR

PROFESSEUR A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE TOURS

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LA PRÉSENCE ET LE RÔLE DU ZINC
CHEZ LES PLANTES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le ~~30~~ ³⁰ Juin 1908, devant la Commission d'examen

MM. DASTRE..... *Président.*

MOLLIARD..... } *Examineurs.*

G. BERTRAND..... }

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1908



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551407_0047

02

SÉRIE A, N° 581

N° D'ORDRE :

1311

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Maurice JAVILLIER

PHARMACIEN SUPÉRIEUR

PROFESSEUR A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE TOURS

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LA PRÉSENCE ET LE RÔLE DU ZINC
CHEZ LES PLANTES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 30 Juin 1908, devant la Commission d'examen

MM. DASTRE..... *Président.*

MOLLIARD..... } *Examineurs.*
G. BERTRAND..... }



LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1908

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

<i>Doyen</i>	P. APPELL, <i>Professeur</i>	Mécanique rationnelle.
<i>Doyen Honoraire</i> ...	G. DARBOUX, —	Géométrie supérieure.
<i>Profess. Honoraires</i> }	L. TROOST.	
	Ch. WOLF.	
	RIBAN.	
<i>Professeurs</i>	LIPPMANN.....	Physique.
	BOUTY.....	Physique.
	BOUSSINESQ.....	Physique mathématique et Calcul des probabilités.
	PICARD.....	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
	H. POINCARÉ.....	Astronomie mathématique et Mécanique céleste.
	Yves DELAGE.....	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
	Gaston BONNIER....	Botanique.
	DASTRE.....	Physiologie.
	DITTE.....	Chimie.
	GIARD.....	Zoologie, Evolution des êtres organisés.
	KÖNIGS.....	Mécanique physique et expérimentale.
	VÉLAIN.....	Géographie physique.
	GOUSSAT.....	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	CHATIN.....	Histologie.
	PELLAT.....	Physique.
	HALLER.....	Chimie organique.
	JOANNIS.....	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	P. JANET.....	Physique (Enseignement P. C. N.).
	WALLERANT.....	Minéralogie.
	ANDOYER.....	Astronomie physique.
	PAINLEVÉ.....	Mathématiques générales.
	HAUG.....	Géologie.
	TANNERY.....	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	RAFFY.....	Application de l'analyse à la Géométrie.
	HOUSSAY.....	Zoologie.
	H. LE CHATELIER....	Chimie.
	N.....	Chimie biologique.
	N.....	Zoologie, Anatomie, Physiol. comparée.
	N.....	Physique.
	PUISEUX.....	Mécanique et astronomie.
	LEDUC.....	Physique.
	HADAMARD.....	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	MATRUCHOT.....	Botanique.
<i>Professeurs adjoints</i> }	MICHEL.....	Minéralogie.
	DAGUILLON.....	Botanique.
	BOUVEAULT.....	Chimie organique.
	BOREL.....	Théorie des fonctions.
<i>Secrétaire</i>	PRUVOT.....	Anatomie comparée.
	CAULLERY.....	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
	A. GUILLET.	

Je dédie cette thèse :

A MA FEMME.

A MES FILLETES, JACQUELINE ET JEANNINE.

A MES PARENTS.

A MES AMIS.

§ 2. Le zinc, aliment nécessaire du <i>Sterigmatocystis</i>	57
§ 3. Extraordinaire petitesse des doses nécessaires. Courbe d'action du zinc.....	63
§ 4. Influence de la température et du temps.....	71
§ 5. Fixation du zinc par le <i>Sterigmatocystis</i>	74
— II. — Zinc et levures.....	81
§ 1. Action du zinc sur la levure-végétal.....	82
§ 2. Action du zinc sur la levure-ferment.....	89
— III. — Zinc et plantes Phanérogames.....	93
§ 1. Historique des recherches antérieures relatives à l'influence du zinc sur les plantes Phanérogames...	93
§ 2. Conditions expérimentales	100
§ 3. Résultats expérimentaux.....	106
§ 4. Fixation du zinc par le blé.....	111

CONCLUSIONS.

Conclusions	115
-------------------	-----

INTRODUCTION.

Composition élémentaire des plantes.

Eléments plastiques et éléments catalytiques. Rôle physiologique des éléments catalytiques Engrais complémentaires.

L'analyse chimique des cendres végétales permet d'y caractériser d'une façon constante de la potasse, de la soude, de la chaux, de la magnésie, de l'oxyde de fer, de la silice, des acides phosphorique, sulfurique, carbonique, chlorhydrique, c'est-à-dire les éléments suivants: C, O, P, S, Cl, Si, K, Na, Ca, Mg, Fe. Si à cette liste on ajoute l'azote et l'hydrogène on arrive à cette conclusion que treize éléments minéraux interviennent dans la composition élémentaire des plantes. Ces éléments sont dans la plante engagés dans des combinaisons variées: combinaisons minérales, dissoutes dans le suc cellulaire, comme les nitrates si abondants chez les Labiées et les Borraginées, précipitées à l'état amorphe, tels le carbonate de calcium des Chénopodées, ou concrétées sous forme cristalline comme le sulfate de calcium des Desmidiées, combinaisons organiques depuis les carbures d'hydrogène et les sels d'acides organiques, corps relativement simples, jusqu'aux plus compliqués des corps ternaires et quaternaires, jusqu'aux protéides phosphorés et aux complexes colloïdaux dont l'étude physico-chimique nous révèle l'existence. L'analyse immédiate a permis d'isoler un nombre considérable de ces combinaisons.

Parallèlement à l'étude chimique des plantes, on a poursuivi, surtout dans ces cinquante dernières années, l'étude physiologique des éléments que l'analyse y rencontre. De très nombreux travaux ont eu pour but de fixer le rôle de ces éléments dans la nutrition végétale ; en France, les noms de BOUSSINGAULT, de GEORGES-VILLE, de RAULIN, de DEHÉRAIN, s'attachent particulièrement à ces recherches.

Bien vite les résultats de ces études ont dépassé les frontières du laboratoire et du champ d'expérience, ils ont transformé la pratique agricole : l'emploi des engrais chimiques, l'accroissement de production qui en est résulté ont modifié profondément les conditions économiques et influé heureusement sur la fortune publique.

Enfin, plus récemment, on s'est proposé de déterminer l'influence exercée par les éléments chimiques sur les fonctions et la structure des plantes ; à cette catégorie de recherches s'attachent chez nous les noms de M. Gaston BONNIER et de plusieurs de ses élèves.

Cependant les treize éléments que j'ai cités plus haut ne sont pas les seuls qui méritent d'attirer l'attention du chimiste, du physiologiste, de l'agriculteur. Il en est d'autres dont l'aire d'extension dans le monde végétal est moins vaste, ou dont la proportion est assez petite pour qu'ils soient vraiment, à notre point de vue, des éléments rares et dont pourtant le rôle biologique peut être considérable.

Tels sont les éléments halogènes autres que le chlore, c'est-à-dire le *fluor*, le *brome*, l'*iode*. On a trouvé le fluor dans les pois et dans l'orge. Le brome et l'iode se rencontrent dans la plupart des plantes marines ; CHATIN a trouvé l'iode dans un grand nombre de végétaux aquatiques et BOURCET l'a décelé et dosé dans 110 plantes sur 235 analysées.

L'*arsenic* est, depuis les remarquables recherches de

M. GABRIEL BERTRAND, considéré comme un élément constant de l'organisme des animaux et des végétaux.

Il en est de même du *bore*, depuis le travail publié par JAY en 1895.

Le *rubidium* et le *cæsium* se trouvent en proportion notable dans la betterave ; d'un kilog de salins de betterave GRANDEAU a retiré près de 2 grammes de chlorure de rubidium. Dans la coca, le thé, le café, le même savant a signalé une quantité non négligeable de rubidium.

Le *lithium*, le *baryum*, sont signalés chez quelques plantes et l'*aluminium*, depuis les recherches de BERTHELOT et ANDRÉ, ne peut presque plus passer pour un élément rare.

On sait, depuis les recherches déjà anciennes de MALAGUTI, DUROCHER et SARZEAUD, que l'*argent* existe dans les *Fucus* en quantité pondérable et à l'état de traces dans nombre de végétaux terrestres.

SARZEAUD, GRANDEAU, DUCLAUX, GALIPPE, LEHMANN et d'autres auteurs trouvent du *cuivre* dans des espèces végétales très diverses.

MAUMENÉ, G. BERTRAND, PICHARD, puis GRIFFITHS rencontrent le *manganèse* dans de nombreuses plantes appartenant aux familles les plus variées ; les feuilles, les jeunes pousses sont particulièrement riches en cet élément.

L'analyse spectrale permet à DEMARÇAY de trouver dans des cendres végétales le *vanadium*, le *molybdène* et le *chrome*.

Nous verrons enfin, et avec plus de détails, que le *zinc* a été signalé dans un certain nombre de plantes.

La liste au reste n'est point close, mais dès maintenant celle-ci comporte, en plus des 13 éléments fondamentaux, au moins 17 autres éléments. Seuls, des perfectionnements apportés aux méthodes analytiques peuvent l'étendre. A ce point de vue, l'analyse spectrale accroît singulièrement

nos moyens d'investigation, mais des méthodes purement chimiques peuvent dans certains cas atteindre ou même dépasser pour la précision des résultats ce procédé pourtant si délicat d'analyse. C'est ainsi que la technique appliquée par M. G. BERTRAND à la recherche de l'*arsenic* chez les êtres vivants peut être citée comme un modèle de sensibilité et d'exactitude.

*
* *

Cette recherche des éléments rares chez les êtres vivants s'inspire-t-elle d'une pure curiosité scientifique ou doit elle élargir notre connaissance des phénomènes biologiques? Rien ne répondra mieux à cette question que rappeler ce que nous savons aujourd'hui du rôle biologique de très petites doses de manganèse.

En 1883, un chimiste de *Tokio*, HIKOROKURO YOSHIDA, avait étudié la laque japonaise, Celle-ci est faite avec le latex blanc laiteux du *Rhus vernicifera* qu'on étale à la surface des objets et qui, abandonné à l'air humide, se transforme en une substance noire insoluble. YOSHIDA avait reconnu que le noircissement à l'air de la laque japonaise ou « *urushi* » est due à l'intervention d'un ferment soluble. Mais ses observations n'établirent pas d'une façon assez nette pour entraîner la conviction, s'il s'agissait ou non d'un phénomène d'oxydation. En 1893, M. G. BERTRAND étudia le latex d'une autre espèce de *Rhus*, le *Rhus succedanea* du Tonkin, arbre à laque voisin de celui du Japon. Il en sépara au moyen de l'alcool fort, d'une part un liquide limpide qui renferme une substance oxydable « le laccol », d'autre part, un précipité qui contient le ferment soluble « la laccase ». M. BERTRAND établit, par une série d'expériences rigoureuses que la laccase est une diastase oxydante, une oxydase. M. BERTRAND a déterminé avec quels composés chimiques la laccase se comporte comme un agent d'oxydation et il a précisé ses conditions

d'activité. Mais le seul point des recherches de ce savant, sur lequel il conviendrait ici d'insister a trait aux relations de la laccase avec le manganèse. En analysant les cendres du précipité complexe qu'est la laccase, M. BERTRAND observa que celles-ci sont très riches en manganèse; elles en renferment de deux à trois 0/0. En soumettant une solution aqueuse de la diastase à une précipitation fractionnée par l'alcool, M. BERTRAND prépara deux autres échantillons inégalement riches en manganèse, et il trouva que l'activité de la diastase est proportionnelle à sa richesse en manganèse. D'autres expériences réalisées avec une laccase d'autre origine donna de ce fait une démonstration irréfutable.

Sans entrer dans le détail des expériences, notons seulement la notion qui s'en dégage: la laccase se comporte comme une combinaison de manganèse et d'un radical organique lié à celui-ci à la façon d'un acide faible.

Ainsi s'introduisait dans la science, cette idée neuve et originale, qu'un élément minéral joue dans les phénomènes oxydasiques un rôle essentiel. Ainsi s'affirmait avec netteté l'importance physiologique d'un élément dont les êtres vivants ne renferment que de très petites quantités. Les découvertes ultérieures, l'activation de certaines oxydases animales par le manganèse (PORTIER), la présence d'un pigment respiratoire à base de manganèse chez un mollusque Lamellibranche, *Pinna squamosa* (GRIFFITHS) n'ont fait que confirmer l'importance biologique de ce métal. Le manganèse est vraiment le type des éléments catalytiques.

Nous sommes moins renseignés sur le rôle des autres éléments dont la fonction paraît devoir être du même ordre et qu'on en peut rapprocher sous la même désignation.

D'après EFFRONT, le fluorure de potassium accroît à très petite dose l'activité de la levure. D'après SALM-HORSTMAR, certaines Légumineuses comme le pois, des Graminées

comme l'orge, n'atteignent pas leur développement complet en l'absence d'aliments fluorés. Du rôle biologique de l'iode chez les plantes, nous ne savons rien, mais on est amené à penser qu'il est loin d'être négligeable si l'on se rappelle l'importance en physiologie animale de l'*iodothyryne*, combinaison iodée, isolée par BAUMANN de la glande thyroïde.

Même remarque à propos du cuivre. Pouvons-nous le considérer comme un élément accidentel, sans intérêt, quand nous le voyons entrer dans la constitution de l'*hémocyanine*, pigment respiratoire des Mollusques ?

Même remarque encore à propos de l'arsenic. Depuis les recherches de M. G. BERTRAND, il apparaît comme un élément si normal et constant de la cellule vivante qu'on est fondé à croire qu'il joue chez les animaux et les plantes un rôle physiologique essentiel.

On le voit, nous ne possédons guère de données précises que sur le manganèse, mais du fait que l'on ne connaît pas le rôle d'un élément chimique, doit-on a priori lui dénier toute activité biologique ? M. QUINTON a excellemment développé cette idée dans son livre sur « *L'eau de mer milieu organique* ».

*
* *

De l'existence d'éléments catalytiques chez les plantes, de leur rôle dont on commence à soupçonner la grandeur, résulte une conséquence d'un intérêt pratique peut être considérable. M. G. BERTRAND l'a fait connaître au congrès international de chimie appliquée tenu à Berlin en 1903. A la suite de ses recherches sur la laccase, considérant le manganèse comme un élément indispensable au fonctionnement de la cellule vivante, ce savant a proposé l'emploi du manganèse comme agent fertilisateur du sol.

Des expériences publiées de 1903 à 1907 ont fait ressortir l'influence favorable du manganèse introduit dans

les milieux de culture de diverses plantes Cryptogames et Phanérogames. Ces expériences sont dues à LOEW et quelques-uns de ses élèves, ASO, NAGAOKA et SAWA, KANTOR, HILLS, GÖSSL, PASSERINI: elles ont vérifié ce fait prévu théoriquement qu'il suffit d'employer une quantité extrêmement petite de métal pour obtenir des résultats quelquefois considérables. C'est ainsi qu'Aso, dans des expériences réalisées dans des casiers de petite surface, voit des récoltes de riz, augmenter de 42 0/0 sous l'influence de quelques millièmes de manganèse. M. G. BERTRAND, dans des expériences faites avec le concours d'un agronome éclairé, M. THOMASSIN, et dans les conditions mêmes de la grande culture, a obtenu pour une culture d'avoine une augmentation de récolte de 22,5 0/0.

Qui ne voit d'emblée l'importance d'une pareille constatation? L'agriculteur augmente sa récolte d'un quart et au prix de quelle dépense? D'une dépense minime puisqu'il suffit pour arriver au résultat, d'épendre au plus 50 kilog. de sulfate de manganèse desséché par hectare, et que le prix du nouvel engrais relativement modeste ne peut que s'abaisser encore par l'extension de son emploi. Il serait souhaitable de voir les agriculteurs français s'éprendre de ces données nouvelles, leur apporter, c'est leur intérêt même, la consécration qu'elles méritent. Déjà à l'étranger, ces idées ont fait plus de chemin que chez nous. C'est ainsi qu'en Bohême, s'exploite déjà une mine de phosphate de manganèse qu'on se propose d'utiliser comme engrais.

Est-on en droit d'espérer des résultats, sinon aussi brillants du moins aussi rémunérateurs, avec d'autres engrais catalytiques ou complémentaires? On ne saurait l'affirmer a priori. Il semble même que les corps qui nous occupent n'agissant qu'à des doses très faibles, le sol en doive toujours renfermer plus qu'il ne faut pour les besoins du végétal. Mais l'expérience seule peut répondre à la question, et c'est aux hommes de laboratoire associés aux praticiens à la résoudre.

*,
*, *

J'expose dans cette thèse des recherches sur la présence et la répartition du zinc chez les plantes. J'examine l'influence qu'il exerce sur quelques plantes Cryptogames et Phanérogames.

A vrai dire, le sujet n'est pas entièrement nouveau. On verra dans la partie historique de ce travail, qu'il a été abordé par plusieurs expérimentateurs, mais, comme j'ai essayé de le montrer dans cette introduction, des faits nouveaux, des idées nouvelles ont surgi qui modifient tout à fait l'esprit dans lequel pareil sujet doit être traité. Je me suis inspiré de ces faits et de ces idées.

Admis depuis plusieurs années au Laboratoire de M. G. BERTRAND, à l'*Institut Pasteur*, où j'ai, avant-celles-ci, pour suivi d'autres recherches biologiques, j'ai puisé dans les publications mêmes de mon maître l'inspiration de ce travail.

Cette thèse sera en quelque sorte le premier développement d'un programme d'études dont il a lui-même dans une de ses notes esquissé le plan. « Ces résultats, écrit-il, à la fin de celle qui a traité l'emploi agricole du manganèse, indiquent une nouvelle voie à suivre dans l'étude des causes auxquelles est attribuable la fertilité du sol, et autorisent à essayer au même titre que le manganèse, tous les éléments rares, bore, zinc, iode..., dont on est en droit de supposer le rôle physiologique ».

Je le remercie de m'avoir ainsi inspiré ce travail et je lui suis reconnaissant du bienveillant intérêt qu'il n'a cessé de me témoigner.

Auprès de M. le Dr Roux, directeur de l'*Institut Pasteur*, j'ai trouvé, comme jadis auprès de son regretté prédécesseur E. DUCLAUX, un accueil très bienveillant et un précieux appui moral. Je le prie de me permettre d'inscrire son nom à la première page de ce travail en témoignage de respectueuse reconnaissance.

PREMIÈRE PARTIE.

Présence du zinc chez les plantes.

CHAPITRE PREMIER.

Historique des recherches antérieures relatives à la présence du zinc chez les plantes. Les plantes calaminaires.

Les premières données relatives à la présence du zinc chez les végétaux, datent d'un peu plus de cinquante ans. L'attention fut tout d'abord attirée par des plantes, croissant abondamment dans des terrains riches en minerais de zinc, calamine ou blende.

Ainsi, dans la région calaminaire qui s'étend de part et d'autre de la frontière germano-belge sur une partie de la Prusse rhénane et de la province de Liège, le promeneur est frappé par l'abondance, en certaines places, d'une pensée à fleurs jaunes que les botanistes ont décrite tantôt sous le nom de *Viola calaminaria*, tel LEJEUNE dans sa *Flore de Spa* (1824), tantôt sous celui de *Viola lutea*, tel SMITH dans son *Compendium de la flore belge* (1828), tantôt, tel KOCH et d'autres auteurs, sous ceux de *Viola*

lutea Sm., var. *calaminaria* ou de *Viola grandiflora* Huds., var. *calaminaria*.

Au cours d'excursions faites à la fin de juillet 1907 entre Aix-la-Chapelle et Liège, j'ai rencontré en assez grande quantité cette espèce de *Viola*. Je l'ai recueillie entre autres lieux, en territoire neutre de Moresnet, sur l'emplacement d'une mine de zinc qu'exploitait autrefois la Société de la Vieille Montagne (1).

C'est une petite plante vivace munie de stolons souterrains dont la tige anguleuse porte des feuilles alternes à limbe lancéolé, denté, s'atténuant en pétiole à la base ; chaque feuille est accompagnée de deux stipules latérales profondément découpées, à lobe moyen étroit, entier, les inférieures digitées. Les fleurs solitaires, zygomorphes, présentent le diagramme type de la famille ; quatre des pétales sur cinq sont tournés en haut, caractère du groupe des pensées. Les pétales sont jaunes, quelquefois l'un jaune veiné de bleu, les quatre autres violets. Le fruit est une capsule déhiscente à trois valves à dos arrondi.

Cette espèce ne se distingue qu'assez péniblement de *Viola tricolor* L. qui l'accompagne dans ses stations. Celle-ci est dépourvue de stolons, ses stipules toutes pinnatifides ont le lobe moyen ordinairement large crénelé ; la fleur a quatre pétales d'un bleu violet et un pétale bleu et jaune veiné ; la capsule a trois valves dont le dos est déprimé sur les lignes placentaires.

Sur les pentes du « Trou de Moresnet » on trouve grou-

(1) Je me fais un plaisir d'adresser mes bien vifs remerciements à M. le Professeur GRAVIS, pour l'accueil cordial qu'il m'a fait à l'Institut botanique de l'université de Liège et à M. LONAY, chargé de cours à la même Université, qui a été pour moi un guide aussi aimable que bien documenté dans l'une de mes excursions. M. le Professeur JORISSEN a mis à ma disposition son laboratoire de l'Institut de Pharmacie et m'a apporté son concours personnel pour les premières manipulations sur les plantes calaminaires. Je lui en suis très vivement reconnaissant. Je ne saurais non plus oublier la sympathique réception que m'ont faite M. BRIS, directeur, et M. NOAILLON, ingénieur-chimiste à l'usine de la Vieille-Montagne, à Chénée.

pées les trois autres plantes dites calaminaires. Ce sont : une Caryophyllée, *Alsine verna* Bartl., petite plante vivace à feuilles petites, linéaires, subulées, sétacées, dépourvues de stipules, à fleurs blanches avec cinq pétales entiers plus longs que le calice, trois styles ; le fruit capsulaire s'ouvre jusqu'à la base en trois valves.

Une Crucifère, *Thlaspi alpestre*, variété *calaminare* Lejeune. Plante bisannuelle à racine pivotante, à feuilles simples, non stipulées, en rosette à la base, à fleurs blanches, à silicule déhiscente, orbiculaire, avec échancrure superficielle toujours dépassée par le style.

Un Plombaginée, *Armeria maritima* Willd., var. *elongata*, plante gazonnante à feuilles simples, radicales, à pédoncules allongés (20 à 40 centimètres), portant des fleurs en capitules involuqués.

Je laisse aux botanistes descripteurs le soin de dire en quoi ces espèces calaminaires diffèrent des espèces types. Ils ne sont pas entièrement d'accord et HOFFMANN pense que les variétés décrites n'existent que dans les livres et point dans la nature.

La première étude chimique dont les plantes calaminaires aient été l'objet, ou du moins la plus ancienne dont j'aie trouvé mention, est consignée dans un travail de BRAUN (1), publié dans les *Poggendorfs Annalen* de 1854. BELLINGRODT, qui analysa des plantes calaminaires recueillies par BRAUN dans la région de la Vieille Montagne, constata dans ces plantes la présence du zinc. Cette recherche fut d'ailleurs purement qualitative.

En 1865, RISSE (2) examine au même point de vue des plantes spontanées ou cultivées, récoltées dans cette même région de l'Altenberg. Il trouve du zinc dans toutes ces plantes et se borne pour la plupart d'entre elles, à un

(1) BRAUN. — Ueber das Vorkommen von Zink im Pflanzenreich. *Poggendorfs Annalen*, t. 92, p. 175 (1854).

(2) RISSE, cité par SACHS — *Handbuch der Experimental Physiologie der Pflanzen*, p. 153 (1865).

essai qualitatif. Il fait des dosages sur quatre d'entre elles, dont trois sont des plantes dites calaminaires. Voici d'ailleurs les chiffres qu'il a publiés (ZnO % de cendres).

	Racines	Tiges	Feuilles	Fleurs
<i>Thlaspi alpestre</i>	1.66	3.28	13.12	3.24
<i>Viola tricolor</i> v. <i>cal.</i>	1.52	0.62	1.16	0.98
<i>Armeria vulgaris</i>	3.58	0.37	1.17	1.15
<i>Silene inflata</i>	0.74		1.92 (T. Fl. Fl.).	

En France, deux régions sont connues par la présence de minerai de zinc, c'est dans le Var, celle des Bormettes et dans le Gard celle de St-Laurent-le-Minier. Des plantes recueillies en 1879 sur le sol à calamine dolomitique de cette dernière région ont été analysées par L. DURAND-CLAYE. Voici, cités d'après un travail de J. DELESSE (1), les chiffres qu'il trouva pour la teneur des cendres en oxyde de zinc :

Buis.....	0.62 (Rac.)	traces (tige)		
Chêne blanc....	0.50 (Rac.)	traces (tige)	0.40 (écorce)	0.30 (Fl.)
Truffes	0.38			

La Haute Silésie est le principal centre allemand de production du zinc. Nombreuses sont les mines aux environs de Tarnowitz, de Beuthen, etc. Des plantes de cette région ont été analysées par KRAUCH (2), en 1883. Des seigles d'aspect malade lui ont fourni en oxyde de zinc 0,76 % de la matière sèche et des herbes cueillies aux abords d'une mine 0,242 %.

JENSCH (3), en 1894, étudiant la flore silésienne, dose le zinc dans *Tussilago farfara* et *Polygonum aviculare*.

(1) DELESSE.— Influence du sol sur la composition des cendres des végétaux. *Société Nationale d'Agriculture de France*, février 1881.

(2) KRAUCH. — Ueber die Wirkung von Zinksulfat und Kochsalzbaltigen Wasser auf Boden und Pflanzen. *Landwirth. Versuch-Stationen*, t. XXVIII, p. 468 (1883).

(3) JENSCH.— Beiträge zur galmeiflora von Oberschlesien. *Zeitschrift für angewandte Chemie*, p. 14 (1894).

Les chiffres ci-dessous expriment en carbonate de zinc la proportion de métal trouvée dans les cendres.

<i>Tussilago farfara</i>	{ 2,51 (pétiotes)	1,75 (limbes)	2,90 (racines)
	{ 3,26 (id.)	1,63 (id.)	2,83 (id.)
<i>Polygonum aviculare</i> ...	{ 2,25 (tiges)	1,24 (feuilles)	1,77 (racines)
	{ 2,86 (id.)	1,49 (id.)	1,93 (id.)

LABAND (1), en 1901, recherche le zinc dans les plantes croissant sur le sol zincifère de Scharley, en Hte-Silésie. Il indique sa technique analytique, qui consiste essentiellement en la destruction de la matière organique par l'acide sulfurique et l'oxyde de mercure, précipitation du mercure par l'hydrogène sulfuré, élimination de l'acide phosphorique, et précipitation du zinc par l'hydrogène sulfuré en milieu acétique. Dans 100 grammes de plante fraîche, il dose 0,2021 de zinc ; dans un autre essai fait par électrolyse, il trouve 0,2018 ‰.

HATTENSAUR (2) analysant en 1890 les cendres de *Molinia caerulea* Mönch., recueillies aux environs de Rabl, en Corinthe, trouve dans celles-ci 0,265 ‰ d'oxyde de zinc. FRICKE (3), en 1900, a observé aux environs de Ramsbeck, en Westphalie, et dans l'Oberharz, dans la région de Lautenthal et du Rammensberg, une Crucifère, *Arabis Halleri*, dont les cendres atteignent une teneur de zinc de 0,94 ‰.

Enfin, CAPPÀ (4) signale la présence du zinc dans des cistes.

Toutes ces recherches s'appliquent à des plantes récoltées sur des terrains fortement zincifères et, pour intéres-

(1) LABAND.— Zur Verbreitung des Zinkes im Pflanzenreich. *Zeitschr. für Nahrungs und Genussmittel*, t. IV, p. 489 (1901).

(2) HATTENSAUR.— Zur chemischen Zusammensetzung von *Molinia caerulea* Mönch. vom Königsberg bei Rabl. *Sitz. Ber. Wien. Akad.* t. IC, II, p. 29 (1890).

(3) FRICKE.— Zinkhaltige Pflanzen. *Z. öffent. Ch.* VI, 292 d'ap. *Chemisches Centralblatt*, t. II, p. 769 (1900).

(4) CAPPÀ.— *Osterr. Zeitschrift f. Berg. und Hütten werke*, t. 53, p. 479

santes qu'elles soient, on ne saurait en retenir que ce fait : les plantes fixent du zinc lorsqu'elles croissent sur des terrains dont la richesse en zinc est considérable et cette fixation paraît être surtout l'apanage d'un petit nombre d'espèces, parmi lesquelles les espèces dites calaminaires tiennent le premier rang.

Mais le zinc est en fait très répandu dans la nature et, en dehors de ses vastes gisements minéralogiques on le rencontre à l'état de traces un peu partout.

DIEULAFAIT (1), en 1880, l'a trouvé à l'état de diffusion complète dans toutes les roches de la formation primordiale et dans les dépôts qui résultent de leur destruction. Il l'a recherché dans les eaux-mères des marais salants, et l'a caractérisé par l'analyse spectrale, il a évalué sa proportion dans l'eau de mer naturelle à au moins 0,000002 par litre.

Aussi est-on amené à penser que peut-être la diffusion du zinc dans le monde organique est plus vaste qu'on ne l'enseigne.

Dès 1865, FORSHAMMER (2) signale le zinc dans des plantes marines ; il le décele dans *Fucus vesiculosus* et l'estime aux trois millièmes du poids des cendres chez *Zostera maritima*. Pourtant il ne peut le caractériser dans l'eau de mer elle-même.

En 1877, LECHARTIER et BELLAMY (3) le caractérisent à l'état de traces dans les grains de blé, de maïs, d'orge, dans la vesce d'hiver, les haricots blancs de Naples, mais ces savants ne peuvent arriver à une caractérisation certaine avec la betterave, la tige de maïs, le trèfle vert et la graine de trèfle.

(1) DIEULAFAIT. — Sur le zinc, etc. *Annales de chimie et de physique*, 5^e S. t. 21, p. 256 (1880).⁵

(2) FORSHAMMER. — On the composition of sea-water in the different parts of the Ocean. *Ph. Tr. Roy. Soc.*, t. 155, p. 203 (1863).

(3) LECHARTIER et BELLAMY. — Sur la présence du zinc dans le corps des animaux et dans les végétaux. *C. R.* LXXXIV, 687 (1877).

RAOULT et BRETON (1), la même année, ne le trouvent pas dans un kilo de bois de réglisse, et DEMARÇAY (2), en 1900, le signale incidemment et grâce à l'analyse spectrale dans les bois de pin sylvestre, d'épicéa, de vigne, de chêne, de charme, de peuplier, à côté d'autres éléments tels que le vanadium, le molybdène, le chrome, le baryum et le plomb.

C'est à ces faits que ce bornent à l'heure actuelle nos connaissances sur le zinc végétal. Nous en trouverons d'autres plus tard, qui résultent d'expériences physiologiques dirigées dans divers sens et que nous aurons à résumer.

Chez les animaux, les essais de BRADLEY (3) ont montré que l'on pouvait le rencontrer chez des invertébrés ; il serait d'après cet auteur un constituant normal des cendres de l'hépatopancréas et du sang de *Sycotypus canaliculatus* (Mollusque gastéropode) et des cendres de *Fulgur Carica*.

LECHARTIER et BELLAMY (4), RAOULT et BRETON (4), ont trouvé le zinc et l'ont dosé dans le foie de l'homme et dans le tissu musculaire. Les œufs de poule, d'après les premiers expérimentateurs, en contiendraient 0,0173 pour mille.

(1) F. RAOULT et H. BRETON. — Sur la présence ordinaire du cuivre et du zinc dans le corps de l'homme. C. R. LXXXV, 40 (1877).

(2) DEMARÇAY. — Sur la présence dans les végétaux du vanadium, du molybdène et du chrome. C. R. CXXX, 91 (1900).

(3) BRADLEY. — Das Vorkommen von Zink in einigen Evertebraten. *Bioch. Cent.*, t. II, p. 430 (1904).

(4) *Loco citato*.

CHAPITRE II.

Technique de la recherche biologique du zinc.

Le progrès dans les sciences expérimentales est étroitement lié au perfectionnement des méthodes de recherche. Aussi ne s'étonnera-t-on pas si je développe ici, avec quelques détails, les questions de technique qui, les premières, m'ont préoccupé.

La caractérisation du zinc est facile. Cet élément présente en effet des caractères analytiques nets. Le plus spécifique consiste en le précipité blanc de sulfure de zinc que produit l'hydrogène sulfuré dans les solutions de ses sels acidulées par un acide organique, formique ou acétique, ou le sulfure d'ammonium dans leur solution ammoniacale.

Avec le ferrocyanure de potassium, les sels de zinc donnent un précipité blanc, légèrement jaunâtre de ferrocyanure de zinc peu soluble dans l'acide chlorhydrique.

Les sels de zinc en solution aqueuse donnent par addition d'ammoniaque, de potasse ou de soude, un précipité gélatineux blanc d'oxyde très facilement soluble dans un excès de réactif.

L'oxyde de zinc blanc à froid devient jaune quand on le chauffe, et reprend sa couleur blanche par refroidissement.

Seules les deux premières réactions sont vraiment spécifiques. Quel est leur degré de sensibilité? Dans la plupart des cas, je ne devais avoir à caractériser que des

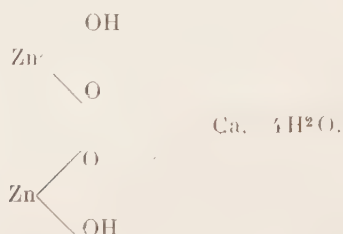
doses extrêmement petites de substance, c'était évidemment le premier point à examiner.

L'hydrogène sulfuré ne permet guère une appréciation nette au-delà du vingt millième. Le ferrocyanure est beaucoup plus sensible; si l'on n'est pas trop limité par le volume du liquide, c'est-à-dire si l'on a au moins 10 centimètres cubes de solution de sel de zinc à sa disposition, on apprécie nettement le cent millième et, en attendant assez longtemps, la formation de ferrocyanure de zinc se trahit par une légère opalescence jusqu'à la dilution très grande de 1/3.000.000. Mais si l'on ne dispose que d'un très petit volume de liquide, un centimètre cube par exemple, on ne peut guère affirmer la formation d'un louche au-delà du vingt millième. J'ai observé que l'addition d'une petite quantité d'un sel neutre agissant comme réactif coagulant, tel le chlorure d'ammonium, recule notablement cette limite. Admettons donc que pratiquement, pour pouvoir caractériser sûrement le zinc par ses deux réactions de l'hydrogène sulfuré et du ferrocyanure, il fallait que la dilution n'en dépassât pas le vingt millième, c'est-à-dire que dans un centimètre cube de liquide il fallait avoir au moins 5 centièmes de milligramme de zinc.

Tout le problème de la recherche de traces de zinc par une méthode chimique se ramenait alors à pouvoir rassembler une quantité de zinc qui ne fût pas inférieure à cinq centièmes de milligramme dans un volume de liquide aussi petit que possible, un centimètre cube par exemple, cette quantité de zinc se trouvât-elle contenue dans un volume même considérable de solution primitive. Or, nous avons étudié, M. G. BERTRAND et moi, une méthode qui réalisait précisément ces desiderata.

M. BERTRAND, distillant de la solution ammoniacale du commerce avec de la lessive des savonniers dans le but d'obtenir de l'ammoniaque bien exempte d'anhydride car-

bonique, avait vu se former sur les parois du ballon distillatoire un dépôt cristallin de quelques centigrammes visible après refroidissement et décantation du liquide. Ces cristaux étaient constitués par du zincate de calcium



La chaux provenait de l'eau, le zinc sans doute de la soude, mais il n'avait pas été possible de l'établir par les méthodes ordinaires d'analyse.

Cette observation déjà ancienne — elle date de 1892 — nous a suggéré l'idée qu'il y avait dans la production de zincate de calcium une méthode très sensible de précipitation du zinc. Notre prévision était exacte.

Lorsqu'on ajoute un excès d'ammoniaque à une solution qui renferme à la fois du zinc et une quantité suffisante de chaux, on obtient, après filtration s'il y a lieu, un liquide limpide qui, porté à l'ébullition jusqu'à disparition complète de l'ammoniaque, laisse déposer peu à peu du zincate de calcium. Ce composé est si peu soluble, que l'on peut par cette méthode précipiter le zinc renfermé même à l'état de traces dans une grande quantité de liquide. De plus, ce composé, précipité à l'état micro cristallin dans un liquide bouillant, est très facile à recueillir sur les filtres qu'il ne traverse pas.

Dans une série d'expériences dont le détail ne saurait trouver place ici, nous avons constaté que la sensibilité de la méthode est très grande puisque nous avons pu précipiter un dixième de milligr. de zinc contenu dans un volume de trois litres de liqueur primitive, recueillir ce

zinc et le caractériser par ses deux réactions de l'hydrogène sulfuré et du ferrocyanure. Enfin la précipitation est vraiment quantitative ; c'est ce que nous avons établi par une série de dosages.

Les résultats que nous avons publiés montrent que notre méthode est très sensible et très précise, très sensible puisqu'elle permet de précipiter au moins (1) $1/30.000.000$ de métal, très précise puisque sa précision n'a d'autre limite que celle de la balance elle-même.

La technique dont je viens de décrire les points essentiels me permettait d'aborder la recherche biologique du zinc dans des conditions expérimentales plus précises que n'avaient pu le faire mes devanciers. Voyons maintenant comment je conduis cette recherche.

La plante ou la partie de plante à examiner est recueillie en évitant de souiller de terre tiges, rameaux et feuilles. Au laboratoire, on sépare, s'il y a lieu, les organes à étudier et on les lave avec soin à l'eau distillée (2). Ce lavage doit être fait d'une façon particulièrement méticuleuse pour les organes souterrains. On garde la dernière eau de lavage pour rechercher si celle-ci ne renferme pas trace de zinc (3) et être bien sûr que le zinc trouvé dans la suite est bien fixé dans la plante et ne provient pas de quelque impureté superficielle. La plante est séchée à 100 degrés et pesée.

Puis la matière organique doit être détruite. Trois moyens s'offrent à l'expérimentateur : l'incinération, la destruction chimique, la combustion dans la bombe de BERTHELOT.

(1) Je dis au moins, parce que cette dilution est la dilution maxima que nous avons expérimentée, et qu'elle peut n'être pas la limite de sensibilité de la méthode.

(2) Et même redistillée dans un appareil en verre.

(3) Je dois dire qu'en fait cette précaution n'a été prise que deux fois et que le résultat négatif de ces deux épreuves m'a engagé à ne pas les renouveler. Avec un peu de soin, on se prémunit aisément contre pareille cause d'erreur.

L'incinération est assurément des trois méthodes la plus pratique, c'est aussi la plus dangereuse : elle peut introduire du zinc là où il n'y en a point, elle peut en faire perdre là où il y en a, et d'autant plus qu'il y en a davantage. Pourtant c'est à l'incinération que j'ai eu recours dans la grande majorité des cas et je dois dire comment ces causes d'erreurs sont évitables.

L'introduction du zinc peut être le fait des brûleurs. Les auteurs qui ont recherché le cuivre dans les organes animaux ou végétaux ne se sont pas assez prémunis contre le risque d'introduire par cette voie du cuivre dans leurs essais, et des travaux, par ailleurs excellents, se trouvent ainsi sujets à contestation. En ce qui concerne le zinc, le risque est moins grand. Je l'ai radicalement écarté dans plus de la moitié de mes expériences, en chauffant le four à moufle non au gaz mais au charbon de bois. Mais le procédé est long et ennuyeux ; il ne met d'ailleurs pas rigoureusement à l'abri de l'introduction du zinc, puisque, comme nous le verrons, la présence du zinc étant très générale, le charbon de bois en doit renfermer lui-même des traces. J'ai également incinéré une vingtaine d'échantillons dans un four à moufle de vastes dimensions dont les brûleurs étaient en cuivre rouge. La matière à incinérer était placée dans une série de petites capsules plates en porcelaine. Je me suis assuré par une expérience témoin, faite en préparant dans des conditions identiques, du charbon de sucre, et recherchant le zinc dans ce charbon qu'il n'y a pas introduction du métal.

J'ai dit en deuxième lieu que l'incinération peut amener une perte de zinc. Ne sachant rien de l'état dans lequel le zinc se trouve dans la plante, nous pouvons seulement présumer que, par l'action de la chaleur, le métal se trouve ramené à l'état d'oxyde. Il en est assurément ainsi s'il est engagé dans quelque combinaison organique. Le danger à éviter est alors la réduction possible de l'oxyde par le

carbone et la perte de totalité ou partie du zinc par volatilisation. Or, l'oxyde de zinc n'est réduit par le charbon qu'au rouge vif, et tout accident sera évité en faisant l'incinération à une température telle que le moufle soit à peine rouge. Si le zinc se trouve dans la plante sous forme de combinaison minérale, sulfate, phosphate ou silicate, il y a peu de craintes de perte; le sulfate se transforme en sulfate basique et en oxyde au rouge vif. En présence du charbon il donne du sulfure peu fusible, dissociable en ses éléments à de très hautes températures seulement; quant au phosphate, il donne du pyro-phosphate et le silicate est stable à haute température.

Au reste, pour trancher la question, j'ai fait les expériences suivantes. Dans une première série d'essais j'ajoutais à un certain poids d'un végétal sec (tige de *Solanum Dulcamara*), un poids connu de zinc sous forme de sulfate ou d'acétate et je dosais ce zinc après incinération, je devais retrouver, et je retrouvais effectivement le zinc introduit.

Dans une deuxième série d'essais, je détruisais à la bombe calorimétrique un poids connu d'une plante riche en zinc (organes souterrains d'*Armeria maritima*) et je dosais le zinc dans le produit de la combustion totale. Parallèlement je dosais le zinc dans les cendres obtenues par incinération au moufle à basse température d'un même poids de la même plante. Les chiffres devaient concorder et concordaient effectivement.

Ce que je viens de dire de la destruction de la matière organique par incinération en vue de la recherche du zinc abrège les développements relatifs aux deux autres modes de destruction que j'ai indiqués.

J'ai, une fois seulement, utilisé la destruction sulfurique; on connaît la technique de la méthode; elle offre toute sécurité si l'on emploie des réactifs rigoureusement purs, mais elle est laborieuse lorsqu'il s'agit de traiter un

nombre élevé d'échantillons et un poids important de ceux-ci.

Enfin, j'ai utilisé la combustion totale par l'oxygène comprimé dans la bombe en platine de BERTHELOT pour l'expérience de contrôle ci-dessus décrite. Il n'est pas douteux que cette méthode, déjà appliquée par M. BERTRAND dans ses recherches très délicates sur l'arsenic, constitue la méthode idéale, éloignant toute cause d'introduction et de perte de zinc. Mais si l'on observe que sous une pression d'oxygène de 20 atmosphères je n'obtenais une combustion complète qu'avec un poids relativement minime de substance, 4 à 5 grammes de bois de mélèze et encore moins d'*Armeria*, on conviendra qu'elle impose un gros travail et qu'elle est difficilement applicable à des séries d'essais.

Les plantes séchées ont donc été, dans la presque totalité des cas, incinérées à basse température, au petit rouge. On obtient dans ces conditions des cendres grises ou mêmes noires dans lesquelles il reste une certaine proportion de charbon. On pèse les cendres obtenues.

Chaque cendre représente un mélange plus ou moins complexe de substances minérales duquel il s'agit de séparer le zinc. Dans ses grandes lignes, cette séparation peut s'exécuter par les méthodes habituellement appliquées en chimie analytique ; pourtant, lorsqu'il n'existe que des traces de zinc noyées dans un grand excès d'éléments étrangers, il est indispensable de prendre un certain nombre de précautions. Nous avons examiné la question à un point de vue général, M. BERTRAND et moi, et j'ai de mon côté modifié quelques détails en vue de l'application de la méthode à mes recherches personnelles.

Dans une capsule en porcelaine, sur un poids connu de cendres, on verse peu à peu de l'acide chlorhydrique étendu de son volume d'eau, on évapore à siccité au bain marie. On traite à nouveau par de l'acide chlorhydrique pur et

on évapore à sec ; cette opération élimine la silice. On reprend le résidu par quelques gouttes d'acide chlorhydrique et de l'eau distillée chaude, ceci à plusieurs reprises, en versant à chaque fois la solution sur un filtre sans plis. Il reste sur le filtre un résidu constitué par les corps insolubles dans l'eau acidulée, et le charbon non détruit. Ce charbon peut retenir du zinc ; on sèche et incinère alors le filtre et son contenu en élevant cette fois la température jusqu'au rouge. Après refroidissement, on reprend ce nouveau résidu par quelques gouttes d'acide chlorhydrique et de l'eau distillée, on filtre et réunit les liqueurs filtrées.

La solution chlorhydrique est versée dans quantité suffisante de solution ammoniacale pure pour que, l'acidité du milieu étant saturée, il reste environ $4\frac{0}{10}$ d'ammoniaque libre, soit environ $20\frac{0}{10}$ de solution ammoniacale. On ajoute quelques centimètres cubes d'eau oxygénée (1) et un peu de lait de chaux (2). Il se fait un précipité volumineux blanc ou non, généralement coloré par l'oxyde de fer et l'oxyde brun de manganèse. Le zinc est resté dans la liqueur ammoniacale et il n'en a pas été entraîné si l'on a eu le soin, comme je l'ai dit, de verser la solution directement dans l'ammoniaque et d'employer un grand excès de celui-ci. On sépare le précipité par centrifugation ou par filtration à la trompe. On le lave, puis on le redissout dans l'acide chlorhydrique concentré et on fait une deuxième précipitation par l'ammoniaque dans des conditions identiques. Nouvelle filtration. On réunit les liqueurs ammoniacales.

La solution ammoniacale renferme avec le zinc et la chaux divers autres éléments : sels alcalins, chlorure de

(1) L'addition d'eau oxygénée a pour but de peroxyder le manganèse et d'assurer sa précipitation totale.

(2) L'addition de lait de chaux n'est pas ici rigoureusement indispensable ; elle est pourtant très avantageuse, surtout lorsque l'on traite des cendres très riches en phosphates alcalins, celles des graines par exemple.

calcium, magnésie, incidemment du cuivre, etc. On porte la liqueur à l'ébullition, on ajoute petit à petit à petit un lait de chaux étendu en quantité suffisante pour libérer totalement l'ammoniaque combinée et pour précipiter tout le zinc à l'état de zincate. Par addition d'eau on maintient à peu près constant le volume primitif du liquide. L'ébullition est poursuivie tant qu'il se dégage des vapeurs alcalines, ce qu'on vérifie en maintenant une bande de papier de tournesol humide dans le col du ballon. Lorsque ce résultat est atteint, il est nécessaire de vérifier par l'addition d'un peu de lait de chaux et en continuant l'ébullition que toute l'ammoniaque est véritablement dégagée. Ceci est capital ; s'il restait un peu d'ammoniaque à l'état de sel, ce serait la preuve qu'il n'y a pas de chaux libre dans la solution, et, dans ce cas, le zincate ne pourrait se former.

Quand toute l'ammoniaque est partie, on filtre ; le précipité renferme le zincate de chaux, de la chaux libre et carbonatée, de la magnésie, il pourrait occasionnellement renfermer de l'oxyde de cuivre, il renferme presque toujours des traces de fer que le traitement ammoniacal n'a pas rigoureusement éliminé. Ce précipité recueilli sur le filtre et les parcelles de celui-ci restées adhérentes aux parois du ballon sont lavés avec de l'eau saturée de chaux. On les redissout avec de l'acide chlorhydrique à 10 % et l'on fait en sorte que la solution obtenue soit encore acide à au moins 5 % d'acide chlorhydrique.

Cette liqueur chlorhydrique est saturée par l'hydrogène sulfuré gazeux.

On laisse reposer pendant quelques heures et on filtre. Le filtre est soigneusement lavé avec de l'eau acidulée par l'acide chlorhydrique et saturée d'hydrogène sulfurée. Le liquide reçu dans une capsule de porcelaine est évaporé au bain-marie à siccité.

Le résidu est redissout dans quelques centimètres cubes

d'une solution, acidulée par l'acide acétique, d'acétate d'ammonium à environ 10 $\%$. On transvase dans un petit flacon et on sature d'hydrogène sulfuré.

Si la liqueur renferme du zinc, on voit se faire, dès le passage des premières bulles de gaz sulfhydrique, un précipité blanc plus ou moins abondant dans les cas les plus favorables, et, dans les cas qui le sont le moins, un nuage blanc à peine perceptible. Dans la plupart des cas, le précipité ne reste pas d'un blanc pur, il se colore par suite de la formation d'un peu de sulfure de fer, tant il est difficile de se débarrasser de traces de ce métal au cours de ces traitements successifs.

De toute façon, on abandonne à lui-même le petit flacon, bien bouché, au moins vingt-quatre heures. Après ce temps, on recueille le sulfure de zinc sur un filtre. Ce sulfure ne traverse pas le filtre si l'on a eu le soin de faire la précipitation dans un milieu renfermant une quantité suffisante d'acétate alcalin — ceci est capital — et si le temps de repos a été suffisamment long; on lave le sulfure avec de l'eau renfermant 5 $\%$ d'acide acétique et saturée d'hydrogène sulfuré. Enfin, on le dissout avec un peu d'acide sulfurique au vingtième, on lave soigneusement le filtre à plusieurs reprises avec de l'eau, et la solution recueillie dans une capsule de platine tarée est évaporée à sec, d'abord au bain-marie, puis par chauffage direct sur une flamme jusqu'à volatilisation de l'acide en excès. Le résidu est du sulfate de zinc anhydre. Si l'on craint que ce sulfate ne soit pas rigoureusement pur, qu'il soit souillé par une trace d'oxyde de fer, on reprend ce résidu par de l'ammoniaque, on filtre la solution ammoniacale, on évapore à siccité dans une capsule de platine tarée; le résidu, jaune à chaud, est transformé en sulfate. Finalement, on pèse ce sulfate de zinc dont le poids, multiplié par 0,4052, donne la quantité de zinc contenue dans la quantité de cendre analysée.

Il importe de s'assurer que le résidu est entièrement soluble dans l'eau (il le serait incomplètement si, par un chauffage trop violent, il s'était formé un peu de sulfate basique) et qu'il donne avec le ferrocyanure de potassium le précipité blanc de ferrocyanure de zinc.

On voit que cette analyse exige une longue série de manipulations, et il faut se demander si, au cours de celles-ci, il ne s'est glissé aucune cause d'introduction de zinc. Celui-ci pourrait provenir des réactifs employés. J'ai facilement écarté cette cause d'erreur en purifiant tous les réactifs. L'eau distillée des laboratoires renferme souvent des traces de zinc comme elle renferme généralement des traces de cuivre, d'étain, de fer. Je l'ai redistillée dans un appareil en verre. L'acide chlorhydrique a été préparé en saturant de l'eau distillée rigoureusement pure par du gaz chlorhydrique pur. L'ammoniaque a été purifiée dans les mêmes conditions. Cette ammoniaque était préparée par petites quantités à la fois, de façon à n'employer qu'une solution peu ou pas carbonatée. Il importait surtout d'avoir de la chaux pure. La chaux, dite pure du commerce, ne l'est pas toujours. Dans l'une d'elles, j'ai trouvé du zinc dont la proportion atteignait le millionième ; j'ai préparé ma chaux moi-même par calcination de l'azotate de calcium pur. J'en ai fait, d'autre part, préparer par une maison de droguerie par calcination de l'azotate préalablement purifié de toute trace de zinc par la méthode au zincate.

Ajoutons aussi qu'il ne faut employer que des filtres de très petite dimension, la cellulose fixant plus facilement que l'on ne pense certaines substances minérales.

Ces précautions prises, la méthode est très exacte et très sensible. Le zinc est extrait des plantes qui le contiennent, même à l'état de trace ; il est caractérisé :

1° Par le précipité blanc qu'il donne avec l'hydrogène sulfuré en milieu acétique ;

2° Par la solubilité de son oxyde dans l'ammoniaque

3° Par la coloration jaune de cet oxyde à chaud ;

4° Par le précipité que donne le ferrocyanure dans la solution du sulfate.

Enfin, on en détermine pondéralement la quantité. C'est même cette détermination pondérale qui m'a conduit à préférer cette méthode chimique à une méthode physique qui m'avait d'abord vivement tenté. Je veux parler de la méthode spectrographique. On connaît la sensibilité de l'analyse spectrale. C'est à elle que l'on doit la découverte de nombre d'éléments depuis le cæsium de KIRCHOFF et BUNSEN jusqu'au lutécium de M. G. URBAIN. C'est la spectroscopie qui avait permis à DEMARÇAY de noter le zinc parmi les éléments des plantes, et c'est à elle qu'avait recouru DIEULAFAY dans ses recherches sur la diffusion du zinc dans le monde minéral.

CHAPITRE III.

Diffusion du zinc chez les végétaux.

J'ai examiné cinquante plantes ou parties de plantes appartenant à 44 espèces choisies dans 30 familles botaniques.

Il ne suffisait d'ailleurs pas de prendre comme sujets d'étude des plantes plus ou moins éloignées dans la classification. Il fallait recueillir ces plantes sur des sols différents au point de vue de leur composition chimique et appartenant à des étages géologiques distincts.

Les plantes recueillies par moi-même l'ont été dans les régions suivantes : en Morvan, aux environs de Lormes (Nièvre) où domine un granit à mica blanc, à grain fin, la granulite des géologues ; en territoire neutre de Moresnet à la frontière germano-belge, sur un sol argilo-calcaire, emplacement du célèbre gîte calaminaire de la Vieille-Montagne ; aux environs de Nuits-Saint-Georges (Côte-d'Or), de Tours et de Paris, sur des sols calcaires appartenant aux terrains médio-jurassique, crétacé et tertiaire.

D'aimables correspondants (1) en ont recueilli quelques-unes : en Auvergne, non loin de Clermont-Ferrand, région à roches éruptives trachytiques ; en Corse, près de Pero-Casavecchia, où dominant le gneiss et les micaschistes des terrains primitifs ; aux environs d'Essen (Prusse rhénane) en terrain houiller. Les deux algues analysées ont été recueillies dans la Manche sur la côte de France à Port-Blanc près de Tréguier (Côtes-du-Nord).

(1) J'adresse mes remerciements à MM. LANZENBERG et AGULHON, de l'Institut Pasteur, à M. DAUMY, de Clermont-Ferrand et à M. HATRY, de Tours.

Quelques échantillons (pour la plupart des graines) ont été achetés dans le commerce, je ne pourrai indiquer l'origine géographique de la plante qui les a fournis.

La majorité des plantes que j'ai analysées proviennent des terrains éruptifs que j'ai signalés, à roches granitoides ou trachydoïdes, où la silice joue le rôle dominant. Dans un important travail qui date de 1880, DIEULAFAY avait démontré l'existence du zinc, à l'état de diffusion complète dans toutes les roches de la formation primordiale et dans les dépôts qui résultent de leur destruction. Il était donc naturel de faire porter les premières recherches sur des plantes croissant dans de tels terrains.

J'adopterai, pour l'exposé des résultats analytiques, l'ordre botanique.

PHANÉROGAMES.

	gr.	Proportion de zinc calculée pour 100 gr.	
		de cendres	de matière sèche
		gr.	gr.
CONIFÈRES. <i>Abies pectinata</i> D. C.			
1. Tige jeune. Lormes			
Proportion de cendres pour 100 gr.			
de plante desséchée.....	1 51		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰⁴ Zn pesé:0,0185; Zn correspondant	0 0075	0 150	0 0023
2. Feuilles de la même plante.			
Proportion de cendres.....	4 7		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰⁴ Zn pesé:0,0088; Zn correspondant	0,0035	0 070	0 0033

		Proportion de zinc calculée pour 100 gr.	
		de cendres gr.	de matière sèche gr
<i>Pinus strobus</i> L.			
3. Feuilles. Lormes.			
Proportion de cendres.....	3 5		
Poids de cendres analysé.....	3 5		
S ⁰⁴ Zn pesé: 0,0089; Zn correspondant	0 0036	0 103	0 003
<i>Larix europæa</i> D. C.			
4. Rameaux avec leurs feuilles. Lormes.			
Proportion de cendres.....	11 8		
Poids de cendres employé.....	5		
S ⁰⁴ Zn pesé: 0,0059; Zn correspondant	0 0020	0 040	0 0047
<i>Juniperus communis</i> L.			
5. Rameaux avec feuilles. Lormes.			
Proportion de cendres.....	6 2		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰⁴ Zn pesé: 0,0059; Zn correspondant	0 0024	0 048	0 0029
GRAMINÉES. <i>Agropyrum repens</i> P. B.			
6. Rhizôme.			
Le Zn n'a pas été caractérisé avec certitude dans 5 gr. de cendres..		»	»
BÉTULACÉES. <i>Betula alba</i> L.			
7. Ecorce. Lormes.			
Proportion de cendres.....	11 3		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰⁴ Zn pesé: 0,0148; Zn correspondant	0 0060	0 120	0 0135
<i>Alnus glutinosa</i> Goetn.			
8. Rameaux. Lormes.			
Proportion de cendres.....	4 9		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰⁴ Zn pesé: 0,0008; Zn correspondant	0 0003	0 006	0 0002

Proportion de zinc
calculée pour
100 gr.
de cendres de matière sèche
gr. gr.

CORYLACÉES. *Carpinus Betulus* L.

9. Feuilles. Lormes.

Proportion de cendres.....	10 3		
Poids de cendres analysé	5		
S ⁰ Zn pesé:0,0042; Zn correspondant	0 0017	0 034	0 0035

CUPULIFÈRES. *Quercus Robur* L.

10. Feuilles. Lormes.

Proportion de cendres.....	6 7		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰ Zn pesé:0,0034; Zn correspondant	0 0013	0 026	0 0017

URTICACÉES. *Ficus carica* L.

11. Feuilles. Corse.

Proportion de cendres	17		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰ Zn pesé:0,0014; Zn correspondant	0 0004	0 008	0 0014

Cannabis sativa L.

12. Graines.

Proportion de cendres.....	12 6		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰ Zn pesé:0,0042; Zn correspondant	0 0017	0 034	0 0043

POLYGONACÉES. *Polygonum fagopyrum* L.

13. Fruits.

Proportion de cendres.....	3 66		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰ Zn pesé:0,0070; Zn correspondant	0 0028	0 056	0 0002

CRUCIFÈRES. *Sinapis alba* L.

14. Graines.

Proportion de cendres.....	9 9		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰ Zn pesé:0,0027; Zn correspondant	0 0011	0 022	0 0022

Proportion de zinc
calculée pour
100 gr.
de cendres de matière sèche
gr. gr.

Thlaspi alpestre, v. *calaminare* Lej.

15. Racines. Moresnet.

Proportion de cendres	9 8		
Poids de cendres analysé	0 98		
S ⁰⁴ Zn pesé: 0,1839; Zn correspondant	0 0745	7 6	0 7448

16. Parties aériennes (tiges, feuilles, fruits).

Proportion de cendres	16 3		
Poids de cendres analysé	1		
S ⁰⁴ Zn pesé: 0,0753; Zn correspondant	0 0305	3 05	0 4971

VIOLACÉES. *Viola lutea* v. *calam.* Sm.

17. Racines. Moresnet.

Proportion de cendres	11 8		
Poids de cendres analysé	0 50		
S ⁰⁴ Zn pesé: 0,0141; Zn correspondant	0 0057	1 14	0 1345

18. Parties aériennes (tiges, feuilles, fleurs).

Proportion de cendres	10 78		
Poids de cendres analysé	2		
S ⁰⁴ Zn pesé: 0,0383; Zn correspondant	0 0155	0 775	0 0835

Viola tricolor L.

19. Plante entière. Moresnet.

Proportion de cendres	11 2		
Poids de cendres analysé	0 50		
S ⁰⁴ Zn pesé: 0,0146; Zn correspondant	0 0059	1 180	0 132

CARYOPHYLLACÉES. *Alsine verna* Bartl.

20. Plante entière. Moresnet.

Proportion de cendres	10 96		
Poids de cendres analysé	1		
S ⁰⁴ Zn pesé: 0,0597; Zn correspondant	0 02419	2 419	0 265

Proportion de zinc
calculée pour
100 gr.
de cendres de matière sèche
gr. gr.

SAPINDACÉES. *Æsculus Hippocastanum* L.

21. Tige. Paris.

Proportion de cendres	»		
Poids de cendres analysé	5		
SO ⁴ Zn pesé:0,0009; Zn correspondant	0 0003	0 006	»

AMPÉLIDACÉES. *Vitis vinifera* L.

22. Tige. Nuits (Côte-d'Or).

Proportion de cendres	12 54		
Poids de cendres analysé	5		
SO ⁴ Zn pesé:0,0037; Zn correspondant	0 0015	0 030	0 0037

LÉGUMINEUSES. *Lens esculenta* Moench.

23. Graines. Auvergne.

Proportion de cendres	8 24		
Poids de cendres analysé	5		
SO ⁴ Zn pesé:0,0144; Zn correspondant	0 0058	0 116	0 0095

Medicago sativa L.

24. Graines.

Proportion de cendres	»		
Poids de cendres analysé	5		
SO ⁴ Zn pesé:0,0041; Zn correspondant	0 00166	0 033	»

Robinia pseudo-acacia L.

25. Feuilles. Lormes.

Proportion de cendres	10		
Poids de cendres analysé	5		
SO ⁴ Zn pesé:0,0014; Zn correspondant	0 00057	0 011	0 0011

ROSACÉES. *Prunus spinosa* Tourn.

26. Rameaux. Nuits.

Proportion de cendres	9		
Poids de cendres analysé	5		
SO ⁴ Zn pesé:0,0008; Zn correspondant	0 0003	0 006	0 0005

Proportion de zinc
calculée pour
100 gr.

de de
cendres matière
sèche

gr.

gr

gr.

PLOMBAGINACÉES. *Armeria maritima*
var. *elongata* Hoffm.

27. Racines. Moiresnet.

Proportion de cendres	6 56		
Poids de cendres analysé	0 50		
SO ⁴ Zn pesé:0,0221; Zn correspondant	0 0089	1 791	0 1175

28. Organes aériens (T. Fl. Fl.).

Proportion de cendres	10 93		
Poids de cendres analysé	1		
SO ⁴ Zn pesé:0,0103; Zn correspondant	0 0042	0 420	0 0459

OLÉACÉES. *Olea europæa* L.

29. Feuilles. Corse.

Proportion de cendres	6 9		
Poids de cendres analysé	5		
SO ⁴ Zn pesé:0,0022; Zn correspondant	0 00089	0 0178	0 0012

Fraxinus excelsior L.

30. Feuilles. Lormes.

Proportion de cendres	10 1		
Poids de cendres analysé	5		
SO ⁴ Zn pesé:0,0005; Zn correspondant	0 0002	0 004	0 0004

GENTIANACÉES. *Gentiana lutea* L.

31. Racine. Auvergne.

Proportion de cendres	5 1		
Poids de cendres analysé	5		
SO ⁴ Zn pesé:0,0092; Zn correspondant	0 0037	0 074	0 0037

SOLANACÉES. *Solanum Dulcamara* L.

32. Tige.

Le zinc n'a pas été caractérisé dans
5 gr. de cendres

» »

	Proportion de zinc calculée pour	
	100 gr.	
	de	de matière
	cendres	sèche
gr.	gr.	gr.

LOGANIACÉES. *Strychnos nuxvomica* L.

33. Graines.

Proportion de cendres.....	7 01		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰⁴ Zn pesé:0,0008; Zn correspondant	0 0003	0 006	0 0004

SCROFULARIACÉES. *Digitalis purpurea* L.

34. Hampe florale et feuilles. Lormes.

Proportion de cendres.....	8 57		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰⁴ Zn pesé:0,0043; Zn correspondant	0 00174	0 037	0 0032

35. Graines. Auvergne.

Proportion de cendres.....	3 4		
Poids de cendres analysé.....	4		
S ⁰⁴ Zn pesé:0,0153; Zn correspondant	0 0062	0 155	0 0053

PLANTAGINACÉES. *Plantago lanceolata* L.

36. Racines, Moresnet.

Proportion de cendres.....	»		
Poids de cendres analysé.....	1		
S ⁰⁴ Zn pesé:0,0903; Zn correspondant	0 0366	3 66	»

37. Tige et feuilles.

Proportion de cendres.....	9 6		
Poids de cendres analysé.....	1		
S ⁰⁴ Zn pesé:0,0225; Zn correspondant	0 00912	0 912	0 0875

CUCURBITACÉES. *Bryonia dioica* Jacq.

38. Rhizôme. Auvergne.

Proportion de cendres.....	5 76		
Poids de cendres analysé.....	5		
S ⁰⁴ Zn pesé:0,0023; Zn correspondant	0 0009	0 018	0 0010

Proportion de zinc
calculée pour
100 gr.

	de cendres	de matière sèche
gr.	gr.	gr.

CAPRIFOLIACÉES. *Sambucus nigra* L.

39. Rameaux avec feuilles et fruits.
Lormes.

Proportion de cendres	10 63		
Poids de cendres analysé	5		
S0 ⁴ Zn pesé: 0,0017; Zn correspondant	0 00069	0 014	0 0015

COMPOSÉES. *Arnica montana* L.

40. Inflorescences. Auvergne.

Proportion de cendres	8 9		
Poids de cendres analysé	5		
S0 ⁴ Zn pesé: 0,0025; Zn correspondant	0 001	0 020	0 0018

Tussilago Farfara L.

41. Feuilles.

Proportion de cendres	26 8		
Poids de cendres analysé	5		
S0 ⁴ Zn pesé: 0,0017; Zn correspondant	0 00069	0 014	0 0037

CRYPTOGAMES.

CHAMPIGNONS. *Psalliota campestris* L.

42. Pied et chapeau.

Proportion de cendres	18 2		
Poids de cendres analysé	5		
S0 ⁴ Zn pesé: 0,007; Zn correspondant	0 0028	0 056	0 0102

Polyporus officinalis Fries.

43. Chapeau.

Proportion de cendres	1 57		
Poids de cendres analysé	2 67		
S0 ⁴ Zn pesé: 0,0089; Zn correspondant	0 0036	0 134	0 0021

Proportion de zinc
calculée pour
100 gr.

	de	de
	cendres	matière sèche
gr.	gr.	gr.

ALGUES. *Laminaria saccharina* Lamx.

44. Thalle. Manche.

Proportion de cendres	14 38		
Poids de cendres analysé	5		
S ⁰⁴ Zn pesé:0,0009; Zn correspondant	0 00036	0 007	0 0010

Fucus vesiculosus L.

45. Thalle. Manche.

Proportion de cendres	24 30		
Poids de cendres analysé	5		
S ⁰⁴ Zn pesé:0,0011; Zn correspondant	0 0004	0 008	0 0019

CRYPTOGAMES VASCULAIRES. *Equisetum limosum* L.

46. Plante entière. Tours.

Le zinc n'a pas été caractérisé dans		
5 gr. de cendres.....	»	»

Pteris aquilina L.

47. Frondes. Essen.

Proportion de cendres.....	14 94		
Poids de cendres analysé	5		
S ⁰⁴ Zn pesé:0,0199; Zn correspondant	0 0080	0 160	0 0239

Polystichum Filix-mas Roth.

48. Rhizôme.

Proportion de cendres	4 64		
Poids de cendres analysé	4 64		
S ⁰⁴ Zn pesé:0,0148; Zn correspondant	0 0060	0 129	0 006

Quels faits d'ordre général peuvent se dégager de ces analyses ? Le premier est évidemment la présence constante ou presque du zinc chez les plantes. Si nous faisons abstraction des plantes dites calaminaires et des plantes recueillies sur des sols très zincifères, tels le *Plantago* recueilli à Moresnet et le *Pteris* d'Essen, on voit que toutes les autres, quelle que soit la région où elles aient été récoltées, renferment des quantités non négligeables de zinc. Il ne me paraît donc plus possible d'écrire, comme avait cru pouvoir le faire DEHÉRAIN dans son excellent traité de chimie agricole : « l'oxyde de zinc se rencontre dans les cendres des plantes qui se développent sur les sols voisins des mines de zinc. » En fait, il faut dire qu'il est très commun dans les cendres des végétaux au même titre que l'oxyde de fer ou l'oxyde de manganèse. Et ce métal se retrouve dans tous les organes des plantes, racines, tiges, feuilles, fleurs, graines des Phanérogames, chapeau des Champignons ou thalle des Algues.

Peut-on dire qu'il soit localisé de préférence dans tel membre du végétal ? Il est difficile de répondre définitivement à cette question. Pour en avoir le droit, il faudrait pouvoir juger non d'après les dosages effectués sur une cinquantaine de plantes mais d'après plusieurs centaines. Et encore faudrait-il faire porter ces essais sur des échantillons recueillis à des époques très diverses de l'année. Mes analyses ont été faites sur des plantes presque toutes recueillies entre le 15 juillet et le 15 septembre. Ce que nous savons des autres éléments chimiques des cendres végétales incite d'ailleurs à la prudence. Rien n'est variable, par exemple, comme la composition des cendres des feuilles des arbres. Jeunes, elles renferment une proportion élevée de potasse et d'acide phosphorique, ces deux éléments représentant alors plus de 50 % des cendres ; plus elles avancent en âge, plus ces deux substances diminuent, tandis que le carbonate de calcium et la silice

augmentent, si bien qu'à la fin de la période de végétation, potasse et acide phosphorique peuvent ne constituer que 10 % du poids des cendres, carbonate de chaux et silice en constituant plus des 3/4. Il en est de même si l'on considère non un de ces éléments fondamentaux, mais un élément catalytique comme le manganèse. Dans les analyses de FLICHE et GRANDEAU, on observe, par exemple, l'accroissement progressif du taux de manganèse dans les feuilles des arbres forestiers avec maximum en septembre-octobre.

Ces remarques faites, et mon intention étant bien marquée de ne pas tirer des expériences plus qu'on ne saurait leur demander, il me semble possible de mettre en évidence quelques points. Les plantes calaminaires étant pour l'instant hors de cause, je remarque que plusieurs des graines analysées présentent un taux élevé en zinc ; celles de digitale d'Auvergne m'en ont donné 5 milligr., 3 % de la matière sèche et 155 milligr. % des cendres ; les lentilles de même origine : 9 milligr., 5 % de la matière sèche et 116 milligr. % des cendres ; les graines de chanvre, luzerne, moutarde sont à un taux moyen avec 34, 33, 22 milligr. % des cendres. La noix vomique fait exception avec 6 milligr. seulement. Pour les feuilles recueillies à la même époque et sur le même terrain les chiffres sont très variables avec les espèces :

Pinus.....	103 milligr. pr 100 gr. de cendres	
Abies.....	70	—
Digitale.....	37	—
Charné.....	34	—
Chêne.....	26	—
Robinier.....	41	—
Frêne.....	4	—

Et ce fait n'est peut-être pas indifférent s'il permet de penser que cette pénétration du zinc dans les plantes n'est pas un fait banal, sans intérêt physiologique, mais qu'il

est au contraire réglé par des besoins déterminés, variables avec les espèces.

Un autre détail ne doit pas rester dans l'ombre : tous les organes des Conifères présentent un pourcentage de zinc élevé :

Sapin (tige)	150 milligr. pr 100 gr. de cendres	
Pin (feuilles)	103	—
Sapin (feuilles)	70	—
Mélèze (tige et feuilles)	40	—
Genévrier (tige et feuilles)	48	—

Et si l'on compare ces chiffres avec ceux que j'ai trouvés pour les plantes d'autres familles — en ne faisant bien entendu porter la comparaison que sur des plantes de même origine géographique — on observe que les chiffres relatifs aux Conifères sont tous plus hauts. Il y a là, à mon sens, une véritable caractéristique au point de vue chimique des Conifères. Ne sait-on pas déjà, et j'ai vérifié le fait, que ces plantes ont des cendres particulièrement riches en manganèse. Ne sait-on pas aussi que leur bois, en cela très différent de celui des Angiospermes, se caractérise par la présence de manno-cellulose (1). Quand nous connaissons mieux la composition minérale et organique des plantes, on verra quels services la chimie peut rendre aux systématiciens. Elle viendra appuyer de ses données les groupements naturels créés par les morphologistes et les anatomistes. Plus précise même parfois que l'anatomie ou la morphologie, elle aidera à discerner les espèces voisines. L'absence de caféine dans les graines de *Coffea Humboldtiana* ne constitue-t-elle pas la meilleure caractéristique de cette espèce de caféier ?

Je note aussi la proportion notable de zinc dans les cendres de *Psalliota campestris* (56 milligr. $\frac{0}{10}$) et de *Polyporus officinalis* (134 milligr.). Le cas de cette dernière espèce est particulièrement intéressant. On sait que

(1) C'est la xylane qui domine chez les Angiospermes.

c'est un champignon lignicole que l'on rencontre dans le Dauphiné et les Alpes attaché au tronc des mélèzes. L'abondance du zinc dans le champignon et dans l'hôte paraît digne de remarque. S'il existe, et cela ne saurait être douteux, une adaptation chimique du parasite à son hôte, il est permis de penser que cette adaptation peut dépendre de la présence chez l'hôte d'un élément minéral en proportion déterminée, même très faible. Sans vouloir prétendre que le zinc soit ici particulièrement en jeu, le rapprochement paraît s'imposer d'autant plus que nous verrons bientôt la prospérité de la culture d'un autre champignon, l'*Aspergillus niger* en dépendance étroite avec la composition du milieu, avec la présence d'une proportion de zinc plus ou moins grande.

Je ne puis rien dire de général au sujet des Algues dont je n'ai examiné que deux espèces. Contrairement à mon attente, elles se sont trouvées peu riches en zinc.

Des deux Fougères analysées, l'une avait crû sur un terrain houiller assez riche en zinc et la plante elle-même a présenté un taux élevé de cet élément (160 milligr. pour 100 gr. de cendres, 23 milligr., 9 pour 100 gr. de matière sèche). Le rhizôme de Fougère mâle possède lui-même des cendres très zincifères (129 milligr. pour 100 gr.) et cette abondance du zinc est à rapprocher de celle du cuivre qu'on a, il y a déjà longtemps, signalée dans cette plante.

Reste à examiner le cas des plantes dites « calaminaires. » Méritent-elles vraiment ce qualificatif? Si l'on veut dire par là qu'elles ont la propriété de fixer le zinc, l'expression est fautive, puisque cette fixation du zinc est un phénomène d'ordre général. Veut-on dire qu'on les rencontre exclusivement sur les sols très riches en calamine, l'expression est encore inexacte, car on les a signalées en des stations qui ne sont pas particulièrement riches en zinc. Mais juste est l'expression si l'on veut dire, non pas que le zinc est, à taux élevé, indispensable à leur nutri-

tion, mais qu'elles supportent mieux que d'autres espèces un excès de ce zinc. C'est une simple question de tolérance. Et leur présence sur les sols à calamine nous apparaît comme un fait particulier de la concurrence vitale, qui, éliminant d'un milieu les espèces non susceptibles d'adaptation aux conditions de ce milieu, n'y laisse subsister que les mieux adaptées. Leur présence est subordonnée à leur capacité d'accommodation, à leur tolérance vis-à-vis des éléments chimiques prédominants du milieu. Ainsi prédominant sur le sol détrempé et saturé de sel des zones côtières les *Statice* et les Chénopodiacées charnues, les *Salsola*, les *Suaeda*, les *Salicornia*.

Le zinc influe sur la distribution des espèces comme facteur « édaphique » à la façon du calcaire, de la silice ou du sel marin.

DEUXIÈME PARTIE.

Influence du zinc sur les plantes.

La présence du zinc chez les plantes établie, la question se pose de savoir quelle est la portée de cette observation.

Ce peut être un fait tout à fait banal. Il y a déjà longtemps, TNINCHINETTI en faisant plonger des plantes dans des solutions salines variées, a montré que les racines absorbent tous les éléments solubles, même inutiles ou dangereux de celles-ci. DEHÉRAIN, qui a repris l'étude du phénomène, a confirmé les conclusions du savant italien.

Nous savons aussi que les composés, même insolubles, comme le phosphate tri-calcique, le carbonate de calcium ou le phosphate de fer sont dissous par les acides ou les sels acides — au reste bien mal connus — que sécrètent les racines.

Mais la plante, dans un mélange complexe, n'absorbe pas indifféremment et également toutes les substances qu'on lui offre ; elle est capable d'exercer un choix parmi celles-ci. L'observation et la pratique agricole en fournissent une preuve. Du trèfle et de l'avoine végétant sur un même terrain se chargent, la première plante de chaux et la seconde de silice. M. DEMOUSSY a donné du phénomène une bonne démonstration expérimentale ; des plantes dont la racine plonge dans un mélange de chlorure et de nitrate

prennent plus d'azote nitrique que de chlore ; en présence du potassium et du calcium, elles choisissent le potassium ; en présence du potassium et du sodium, elles peuvent laisser complètement de côté le sodium tandis que le calcium n'empêche pas l'absorption du sodium.

Ainsi, au point de vue de l'absorption des matières salines par les végétaux, nous trouvons établies deux notions qui ne s'excluent pas : d'une part pénétration de tous les éléments même nocifs, d'autre part sélection entre les éléments offerts.

Il s'agissait de rechercher, pour le cas particulier du zinc, s'il représente un élément utile, indifférent ou dangereux, et d'établir expérimentalement si, dans un milieu complexe, il est choisi ou délaissé par le végétal. C'est, appliquée au zinc, la méthode synthétique employée par nombre d'expérimentateurs pour d'autres éléments.

Pour faire cette étude, j'ai choisi trois types de plantes bien différents au point de vue de leur mode de vie : une moisissure, des levures, des Phanérogames.

CHAPITRE PREMIER.

Zinc et Aspergillus niger.

§ 1. Recherches de RAULIN et de M. H. COUPIN.

La moisissure que j'ai étudiée est l'*Aspergillus niger* Van Tieghem (synonymes : *Sterigmatocystis nigra* Van Tieghem, *Sterigmatocystis antacustica* Cramer, *Eurotium nigrum* de Bary). Cette moisissure a été décrite par M. VAN TIEGHEM dans son mémoire sur la fermentation gallique. Elle est formée d'un mycélium filamenteux, cloisonné, ténu, blanc. De ce mycélium partent des conidiophores dressés, à membrane épaisse et hyaline, qui se renflent à leur extrémité en une vésicule sphérique, recouverte de basides rayonnantes claviformes, couronnées chacune d'environ quatre stérigmates. Les conidies sont globuleuses de $3\mu 5$ à $4\mu 5$, finement verruqueuses, brun violacé ou brun noir quand on les voit en masse. Cet *Aspergillus* pousse sur les fruits acides, le pain mouillé de vinaigre, etc. On se le procure facilement en mettant des cerises à moisir ou en abandonnant à l'air un milieu liquide dont je rappellerai plus loin la composition.

Cette Mucédinée (ordre des Ascomycètes, famille des Périsporiacées) a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux. Ils en ont fixé la biologie dans les plus petits détails si bien que ce *Sterigmatocystis* est de toutes les moisissures la mieux connue au point de vue physiologique.

Les seuls travaux que je retiendrai ici sont ceux qui se rapportent directement au sujet de cette thèse.

En 1870, RAULIN présenta comme thèse de Doctorat (1), une étude très remarquable de l'*Aspergillus*. Il fit pousser le champignon dans différents milieux artificiels et il parvint à déterminer la formule d'un milieu liquide tellement approprié à la vie de l'*Aspergillus* qu'il obtenait, dans des conditions physiques convenables, des récoltes abondantes et de poids constant. Il précisa les lois suivant lesquelles l'*Aspergillus* varie en poids avec la température, l'état hygrométrique de l'atmosphère, le renouvellement de l'air et la forme des vases. Il mit en évidence l'influence de tous les éléments chimiques du milieu type et détermina le coefficient d'utilité de chacun d'eux. Et c'est ici que se place l'observation capitale à laquelle je dois m'arrêter ; elle a trait à l'influence très remarquable et un peu inattendue du zinc.

A vrai dire, RAULIN avait pressenti l'importance du rôle que certains éléments chimiques jouent dans les phénomènes biologiques à des doses même extrêmement faibles. Dans la première partie de sa thèse, intitulée : « Progrès de la chimie des végétaux sous le rapport des « méthodes », après avoir rappelé l'existence dans le sol arable de très petites quantités de la plupart des corps simples, il écrit : « Au point de vue physiologique, il n'est « pas permis de négliger ces corps simples dont il n'existe « que des traces dans les milieux ambiants et dont on « peut ne pas tenir compte dans les réactions de la chimie « minérale ; en effet, grâce à l'étendue illimitée de ces « milieux, à la mobilité de leurs parties, à la durée de la « vie des végétaux, les quantités les plus insaisissables « d'un élément de l'air et du sol peuvent, en s'accumulant, « produire sur les végétaux des effets appréciables ». Malgré ce qu'a d'imprécis, d'inexact même en certains points, si on l'analyse à la lumière de nos connaissances

(1) RAULIN.— Etudes chimiques sur la végétation. *Thèse pour le Doctorat ès-sciences physiques*. Paris, 1870, rééditée en 1905.

actuelles, le texte que je viens de citer, il n'en renferme pas moins l'énoncé d'une vue originale et juste.

Comment en a-t-il donné lui-même une vérification ? Ses premières expériences avaient été faites dans des conditions expérimentales peu rigoureuses, les sels n'étaient pas purifiés, les vases étaient de poterie grossière et quand il perfectionna sa technique en n'employant que des corps purs et des cuvettes de porcelaine, il vit les récoltes baisser singulièrement. D'autres éléments devaient donc entrer dans la composition du milieu. Aux composés qui le constituaient jusqu'ici, c'est-à-dire : eau, sucre, acide tartrique, sel ammoniacal ou nitrate, acide phosphorique, potasse, magnésie, acide sulfurique, il fallait ajouter quelque chose. C'est l'origine de nombreuses expériences au cours desquelles il voit certains sels et entre autres ceux de fer et ceux de zinc, élever dans de grandes proportions le poids des récoltes : les rapports du poids des récoltes avec et sans zinc oscillent entre 2 et 4,6; ceux des récoltes avec et sans fer entre 1,4 et 2,7. En calculant le rapport qui existe entre le poids de fer ou le poids de zinc ajouté dans le milieu artificiel et l'augmentation de récolte qui résulte de cette addition, il trouve qu'un gramme de zinc suffit à augmenter la récolte de 953 grammes et un gramme de fer de 857 grammes. Ces chiffres, 953 et 857 sont les coefficients d'utilité spécifique du zinc et du fer. L'intervention de ces éléments en proportions aussi petites pour former des poids de matière organique aussi grands est assurément très remarquable; elle le paraîtra encore davantage si l'on rapproche de ces coefficients les chiffres exprimant l'utilité spécifique des autres éléments :

Azote.....	17
Potassium.....	64
Phosphore.....	157
Magnésium.....	200
Soufre.....	346
Silicium	320

Cette observation faite, RAULIN ajoute : « J'irai plus « loin, on ne saurait affirmer que le nombre 953, ni « même un autre nombre, quelque grand qu'on l'imagine, « représente la limite supérieure du poids du végétal au « poids d'un élément chimique qui concourt à le former », et nous verrons combien prudente a été cette réserve.

Cette influence de quantités de matière infiniment petites sur la végétation de l'*Aspergillus*, explique, dit encore RAULIN, « pourquoi cette Mucédinée acquiert un certain « développement dans un milieu où l'on a supprimé l'élé- « ment azoté ou l'acide phosphorique ou le fer ou le « zinc, etc. ; ce n'est pas que ces éléments soient pour « le végétal des excitants utiles dont il peut à la rigueur « se passer ; tous au contraire sont indispensables, même « le zinc, même le fer, mais ceux qu'on a cru supprimer « existent en même temps que les autres parmi les impure- « tés du milieu ».

Ces passages étaient à citer, car ils résument nettement la pensée de RAULIN. La doctrine dont ils sont l'expression conserve d'ailleurs un intérêt tout actuel ; aujourd'hui encore, pour certains auteurs, les éléments rares des plantes se comportent uniquement comme des excitants de la nutrition, sans d'ailleurs qu'on puisse se prononcer sur le mécanisme de cette excitation. Pour d'autres, ils se comportent comme des agents actifs, indispensables au jeu de certaines réactions biologiques, comme des agents *catalytiques* ; c'est à cette dernière interprétation que je me rattache nettement et d'autant plus fermement qu'elle est mieux aujourd'hui qu'une hypothèse, puisqu'elle a reçu avec le manganèse une première et brillante vérification expérimentale.

Les faits établis par RAULIN, admis et commentés dans les ouvrages classiques, sont particulièrement mis en valeur par DUCLAUX (1) ; il les montre projetant une vive

(1) *Traité de Microbiologie*, t. I, p. 176 et sq.

lumière sur nombre de phénomènes biologiques. C'est ainsi qu'il écrit : « Si l'on songe que dans un liquide qui contient seulement 1/50000 de zinc, une ou deux générations d'*Aspergillus* peuvent, en absorbant complètement ce métal, rendre l'existence d'une nouvelle génération chétive ou impossible, que dans un tel liquide un nouvel ensemencement, j'allais dire une nouvelle inoculation, resterait sans effet, qui pourrait ne pas être surpris de la perspective qui s'ouvre sur les propriétés si merveilleuses et si étranges du vaccin qui ne s'implante pas deux fois de suite sur le même organisme ».

Puis ailleurs, dans un autre ordre d'idées, il insiste sur la complexité des phénomènes de végétation chez les plantes microscopiques, s'étonne qu'on les croie parfois si simples chez les végétaux supérieurs et il ajoute : « Lorsque, pour assurer la bonne tenue d'une culture, on se contente de rendre au sol du phosphore, de la potasse, de la magnésie et des composés azotés, n'est-il pas évident qu'on compte sur le sol pour fournir les autres éléments utiles sans savoir quels ils sont. Si le sol peut faire ce qu'on lui demande, tout va bien ; s'il ne le peut pas ou si, à un moment donné, il ne le peut plus, et si l'élément disparu de la sole est du même ordre que le zinc pour l'*Aspergillus*, par exemple, on voit la récolte baisser et on pourra, dès lors, augmenter la dose d'engrais potassique ou azoté au-delà de toute mesure, on verra cette fumure intensive échouer là même où elle réussissait naguère ». J'insiste, trop longuement peut-être, sur ces commentaires, mais c'est dans l'intention de bien marquer que cette action du zinc ne constitue pas un phénomène accidentel, d'intérêt restreint, mais au contraire un phénomène d'ordre général et de portée très haute.

Il importe donc que le fait soit établi avec certitude, que la technique expérimentale qui l'a vérifié soit à l'abri des critiques, sans quoi l'on verra s'écrouler, avec l'observation elle-même, toutes les conséquences qu'on en a tirées.

Or, il faut bien le dire, la technique de RAULIN n'est pas toujours d'une absolue rigueur et, dans cette thèse justement célèbre, j'avoue admirer les vues générales et les considérations biologiques bien plus que la partie purement expérimentale.

C'est sans doute sous l'empire d'une impression analogue que M. Henri COUPIN (1) a été conduit en 1903 à répéter les expériences de RAULIN. Le perfectionnement apporté par lui à la technique de ce savant a consisté en la substitution de ballons aux cuvettes plates, de milieux stériles à des milieux qui ne l'étaient point. Il supprimait ainsi pour le *Sterigmatocystis* la lutte avec les autres êtres vivants. C'était évidemment là des conditions plus rigoureuses. Des résultats obtenus par M. COUPIN, dans ces nouvelles conditions expérimentales, je ne retiens que ceux qui ont trait au zinc. Il constate que le *Sterigmatocystis* cultivé en milieu privé de sulfate de zinc croît aussi bien, atteint en un même temps le même poids que le *Sterigmatocystis* cultivé en liquide de RAULIN normal. Il donne alors le sulfate de zinc comme inutile pour le développement de cette moisissure et il explique cette divergence en admettant que dans les expériences de RAULIN, le sulfate de zinc a simplement agi comme antiseptique, empêchant le développement des organismes étrangers et, par suite, favorisant grandement celui du *Sterigmatocystis*.

Bien plus, M. COUPIN observe que le sulfate de zinc est légèrement nuisible au *Sterigmatocystis*. Il constate que toute culture privée de zinc prend une avance manifeste sur celles qui en renferment, cette avance s'accroissant les jours suivants, et les autres cultures ne la rattrapant qu'ultérieurement. Non seulement le zinc est inutile, mais en outre, il retarde le développement de la Mucédinée.

Enfin, M. COUPIN a reconnu que le zinc tue le jeune

(1) Henri COUPIN. Sur la nutrition du *Sterigmatocystis nigra*, C. R., t. CXXXVI, p. 392 (1903).

mycélium, quand celui-ci est cultivé dans un liquide insuffisamment nutritif.

On serait tenté de dire qu'il y a contradiction entre les résultats de M. COUPIN et ceux de RAULIN, si l'on ne se rappelait que, dans les sciences expérimentales, il ne saurait y avoir de contradictions. Il n'y a que des phénomènes dont les conditions nous sont incomplètement connues, des faits dont le déterminisme nous échappe ; c'est le devoir des expérimentateurs de concilier les faits apparemment contradictoires. Or, je l'avoue, expliquer la divergence des résultats par le seul pouvoir antiseptique du sulfate de zinc employé par RAULIN à la dose de 0 gr. 07 pour 1580 gr. de milieu m'a paru un peu aléatoire.

Dans cette étude physiologique du zinc, j'étais donc conduit à essayer de trancher la question. Les expériences que je vais exposer confirment, — et au-delà — les conclusions de RAULIN ; elles montrent aussi quelle circonstance peut entraîner des conclusions de sens inverse.

§ 2. Le zinc, aliment nécessaire du *Sterigmatocystis*.

Il convenait d'abord de rendre la technique aussi précise que possible. Je la reproduis avec tous les détails qu'elle comporte.

Préparation des milieux de culture. — Je prépare du liquide de RAULIN, sans sulfate de zinc, dont voici la formule :

Eau distillée.....	1.500 grammes
Sucre candi.....	70 —
Acide tartrique.....	4 —
Nitrate d'ammoniaque.....	4 —
Phosphate d'ammoniaque...	0.60 —
Carbonate de potasse.....	0.60 —
Carbonate de magnésie.....	0.40 —
Sulfate d'ammoniaque.....	0.25 —
Sulfate de fer.....	0.07 —
Silicate de potasse.....	0.07 —

Le sucre, l'acide tartrique et les sels doivent être rigoureusement purs. Pour m'assurer qu'ils ne renferment pas de zinc, j'applique la méthode au zincate de calcium précédemment décrite à un mélange de ces substances fait dans les mêmes proportions relatives et absolues que ci-dessus.

Si le résultat est négatif, les produits sont utilisables, sinon il y a lieu de les purifier ; si l'on a fait porter l'essai sur chaque sel en particulier, on purifie seulement celui qui peut être incriminé. L'eau distillée doit être également très pure ; celle des laboratoires ne l'est jamais. Je la redistille dans un appareil en verre et sous pression réduite.

Le liquide préparé, je le répartir dans des matras de deux litres ou mieux dans des fioles coniques d'Erlenmeyer de un litre et demi. Ces récipients ont été soigneusement nettoyés à l'acide sulfurique chaud, puis lavés à fond à l'eau redistillée. Malgré ces précautions, il n'est pas impossible que le verre cède des traces infinitésimales de zinc au liquide. En analysant, dans un autre but, un sable de Nemours considéré comme suffisamment pur, puisqu'il sert à la fabrication des verres d'optique (1), j'y ai rencontré, entre autres métaux, des traces de zinc que j'aurais pu facilement doser avec une prise d'essai suffisante. Il n'y a donc rien d'invraisemblable à penser que le verre puisse renfermer des traces de zinc et en céder, surtout à chaud, une quantité, évidemment impondérable, à un liquide acide.

Quoi qu'il en soit, chaque récipient reçoit 250 centimètres cubes de liquide et j'ajoute, dans une série de ces vases (série A), du sulfate de zinc cristallisé $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en quantité correspondant à celle qu'indique RAULIN. Pour

(1) Ce sable m'avait été obligeamment remis par M. VERNEUIL, professeur au Conservatoire National des Arts et Métiers à qui j'adresse tous mes remerciements.

250 centimètres cubes, cette dose est de 0 gr. 01120 correspondant à 0 gr. 00255 de zinc, c'est-à-dire que le liquide de RAULIN normal renferme sensiblement 1/100.000 de zinc (1). Une autre série de ces vases (série B) ne reçoit pas de sulfate de zinc. Les matras ou les fioles coniques sont bouchés à l'ouate et stérilisés par chauffage à l'autoclave, à 115° pendant une demi-heure.

Après quelques heures d'étuve, on ensemence aseptiquement chacun des matras avec des spores d'*Aspergillus niger* prélevées largement sur une culture pure de cette Mucédinée cultivée sur milieu privé de zinc. J'insiste sur deux points : la nécessité de prélever la semence sur une culture où l'opérateur n'a pas introduit de zinc, la raison de ce détail est trop évidente pour qu'il soit nécessaire d'insister, et la nécessité de faire un très large prélèvement.

On sait comment RAULIN faisait ses ensemencements : il promenait un pinceau chargé de conidies à la surface du milieu de culture ; la germination commençant en de multiples points, le Mycélium avait vite fait de couvrir toute la surface libre et c'était une condition très favorable à la constance en poids des récoltes.

J'ai, en effet, vérifié expérimentalement, et il était facile de le prévoir, que les rendements, en un temps donné, varient avec le nombre de conidies ensemencées, si ce nombre reste très petit. Au-dessus d'un certain minimum les rendements deviennent constants. Il importe donc d'ensemencer assez largement pour se tenir sûrement très au-delà de ce minimum. On y parvient facilement en opérant le prélèvement au moyen d'un long fil de platine sur une culture faite dans une fiole plate.

On agite vivement pour répartir uniformément la semence ; quelques spores sont noyées, mais la plupart surnagent et on porte les deux séries de matras au thermostat à 34°.

(1) Et non 1/50.000 comme l'écrivent les auteurs.

Comment se comportent alors les deux séries de cultures ?

Dans celles de la série B (sans zinc) comme dans celles de la série A (avec zinc) la germination débute en de multiples points de la surface et le mycélium envahit bien vite toute celle-ci. Au bout de 24 heures, il y a dans tous les matras un tapis mycélien continu. Il présente déjà dans les deux séries des différences d'aspect, mais celles-ci sont plus nettes au deuxième jour.

Vers la quarante-huitième heure, dans les cultures privées de zinc, l'*Aspergillus* constitue un voile mince, grêle, presque transparent et qui se plisse aux moindres mouvements qu'on imprime au liquide ; dans les cultures pourvues de zinc, l'*Aspergillus* constitue une membrane assez épaisse, blanche, rigide, dont la surface présente des valonnements. Déjà, à la 48^{me} heure, les cultures privées de zinc ont formé de nombreuses spores ; sur toute la surface, on voit de multiples points noirs qui sont autant de bouquets de conidies ; rien de pareil sur les cultures pourvues de zinc qui sont uniformément blanches ; à peine observe-t-on de rares points noirs à la périphérie.

Au 3^{me} jour, soit au bout de 72 heures, les *Aspergillus* de la série B ont leur surface entièrement noire ; le mycélium est resté mince, sa surface inférieure est unie et jaune, ceux de la série A commencent seulement à sporuler, le mycélium est épais, sa surface inférieure blanc-jaunâtre est anfractueuse.

Au 4^{me} jour, les cultures sans zinc n'ont pas sensiblement changé d'aspect ; les cultures avec zinc se sont couvertes de spores noires. L'expérience est arrêtée (1).

(1) Prélève-t-on à ce moment sur les cultures sans zinc quelques appareils conidiens pour les examiner au microscope, on observe parfois sur quelques-uns d'entre eux une intéressante modification de forme : on voit, dépassant les chapelets de conidies, quelques stérigmates allongés et stériles. Cette forme tératologique rappelle celle qui a été décrite par M. MOLLIARD et COUPIN pour l'*Aspergillus* privé de potassium. Mais, ici, les variations mor-

On décante le liquide de chacun des matras, on lave soigneusement à l'eau distillée et à deux reprises au moins la surface inférieure des mycéliums, on réunit les eaux de lavage au liquide cultural. On recueille les *Aspergillus* ; ceux de la série A ont une consistance ferme, les fragments en sont élastiques ; ceux de la série B ont une consistance molle, le toucher en est mou et visqueux. On presse à la main ces mycéliums, on les sèche à environ 60°, puis à 100-105°, jusqu'à poids aussi constant que possible.

On note les poids de matière sèche.

Je trouve ainsi, dans une expérience qui comportait dix cultures, les poids suivants pour les *Aspergillus* de la série A (avec zinc) :

4 gr. 59 4 gr. 10 4 gr. 27 4 gr. 47 4 gr. 43

et pour les *Aspergillus* de la série B (sans zinc) :

1 gr. 46 1 gr. 80 1 gr. 45 1 gr. 61 1 gr. 65

Si nous totalisons les poids, nous trouvons pour les cultures A 21 gr. 86, soit un poids moyen de 4 gr. 372 et pour les cultures B, 7 gr. 97, soit un poids moyen de

1 gr. 594. Le rapport $\frac{4,372}{1,594} = 2$ gr. 742, c'est-à-dire que

les cultures avec zinc ont atteint en 4 jours un poids près de trois fois supérieur à celui des cultures sans zinc.

Dans quelle mesure ces cultures ont-elles épuisé leur milieu ? C'est ce que l'analyse de celui-ci peut nous apprendre. J'étends à 500 cm³ les liquides recueillis comme je l'ai dit plus haut, et je dose dans chacun d'eux le sucre interverti restant et je calcule le sucre consommé. Je

phologiques n'acquièrent jamais l'importance de celles qu'ont observées ces savants ; celle que je décris ne s'est pas retrouvée avec une suffisante constance sur mes cultures sans zinc pour que je puisse faire autre chose que la signaler incidemment.

trouve, pour le sucre restant dans les milieux de la série A :

0 gr. 50	0,36	1,50	0,65
----------	------	------	------

de la série B :

7 gr. 20	7,10	7,90	7
----------	------	------	---

et pour le sucre consommé par les *Aspergillus* de la série A :

11 gr. 45	11,59	10,45	11,30
-----------	-------	-------	-------

et de la série B :

4 gr. 75	4,85	4,05	4,95
----------	------	------	------

Résumons donc ces observations : privé de zinc, l'*Aspergillus* acquiert un aspect tout à fait différent de celui qu'il présente dans le liquide de RAULIN normal ; son mycélium constitue un voile mince à surface lisse ; il manifeste une hâte tout à fait évidente à former ses organes de reproduction, ses conidies, et cette hâte est peut-être bien à interpréter comme l'indice d'un état de souffrance de la plante. Au bout de 4 jours, cet *Aspergillus* atteint un poids qui n'est guère que les $\frac{37}{100}$ de celui qu'il acquiert dans les conditions normales. Arrivé au terme de son développement, il laisse inutilisé dans son milieu de culture environ 60 % du sucre qu'il aurait consommé en présence du zinc.

La privation du zinc entraîne donc chez l'*Aspergillus* tout un ensemble de modifications morphologiques et physiologiques. Met-on à sa disposition une quantité de zinc égale seulement à $\frac{1}{100.000}$, il reprend l'aspect morphologique habituellement décrit et il ne forme ses appareils de reproduction qu'au moment où l'aliment de son milieu est sur le point d'être complètement épuisé.

On ne saurait donc dire que le zinc est inutile et *a fortiori* nuisible au *Sterigmatocystis*. Au contraire, il constitue pour cette Moisissure un aliment nécessaire.

*
*
*

Si nettes que fussent les différences que je viens de décrire, j'avais pensé pouvoir les accentuer encore en cultivant l'*Aspergillus*, non dans des récipients de verre — j'ai dit quelles craintes d'introduction de zinc pouvaient subsister de ce côté — mais dans des récipients de platine.

J'ai fait une expérience dans de petites bouteilles de platine chacune renfermant 25 cm³ de milieu de culture. Avec le milieu sans zinc, j'ai obtenu en 4 jours, à 34°, 0 gr. 200 de récolte ; avec le milieu additionné de zinc, 0 gr. 455. Dans le premier flacon, il restait encore 0 gr. 62 de sucre réducteur ; dans le deuxième, le sucre avait entièrement disparu. Les différences sont donc du même ordre que dans les expériences précédentes, il n'y avait pas à persévérer dans cette voie.

§ 3. Extraordinaire petitesse des doses nécessaires. — Action des doses élevées. — Courbe d'action du zinc.

La dose de zinc adoptée par RAULIN dans la formule du milieu type, connu sous le nom de liquide de RAULIN, est-elle la dose optima ? En admettant que cette dose fût vraiment la dose optima dans les conditions expérimentales où s'était placé ce savant (et encore le fait n'est-il pas établi dans sa thèse), il n'en résultait pas nécessairement que cette dose fût aussi la dose optima dans les conditions expérimentales où je me plaçais moi-même.

J'étais donc amené à déterminer celle-ci.

Je fais une première série d'essais en matras de 2 litres dans lesquels j'ajoute à 250 cm³ de milieu de culture des doses croissantes de zinc depuis 1/10 de milligramme jusqu'à 2 mmgr. 5.

L'expérience étant préparée et conduite dans le détail comme je l'ai exposé précédemment, j'obtiens les résultats suivants :

Zn introduit dans 250 c ⁵ de milieu	Dilution 1 gr. de Zn dans	Poids secs d' <i>Aspergillus</i>	Sucre restant
0 milligr.	—	2,93 (1)	4,25
0 — 1	2.500.000	4,43	1,50
0 — 2		4,43	1,30
0 — 3		4,28	0,40
0 — 4		4,22	0,50
0 — 5	500.000	4,40	0,55
0 — 6		4,10	0,50
0 — 7		4,10	0,50
0 — 8		4,12	0,50
0 — 9		4,38	0,50
1 —	250.000	4,43	0,37
1 — 5		4,47	0,35
2 —		4,38	0,55
2 — 5	100.000	4,40	0,50

Ainsi, au lieu d'observer l'accroissement de poids régulier que j'escomptais, j'obtiens des récoltes de poids sensiblement égal, que j'aie introduit dans le milieu 0 gr. 0001 de zinc ou 0,0025, c'est-à-dire que la dilution du métal ait été de 1/2.500.000 ou de 1/100.000.

On remarquera sans doute que les récoltes ne sont pas rigoureusement égales. Il faut tenir compte d'abord de ce fait que nous avons affaire ici à un organisme vivant, non à une combinaison chimique, que les rendements ne sauraient de ce chef avoir une constance mathématique. Il faut tenir compte surtout de ce détail important que les matras, même choisis avec soin, ne présentant pas un fond de diamètre rigoureusement égal, l'étendue de la surface libre du liquide varie avec chacun d'eux ; c'est la principale cause des variations observées. En groupant tous les essais que j'ai effectués sur ce sujet, je trouve que mes chiffres sont égaux à 5,7 % près. On sait que RAULIN, dans ses cuvettes plates, obtenait des récoltes constantes

(1) Ce chiffre a été exceptionnellement élevé.

à 5 $\frac{0}{10}$ près. Pour les cultures renfermant les doses moyennes de zinc que je définirai, les poids extrêmes sont 4 gr. 10 et 4 gr. 60, moyenne 4,35.

Désireux d'atteindre à une plus grande précision, j'ai, dans plusieurs séries d'expériences, substitué aux matras des fioles coniques d'Erlenmeyer de 1 litre $\frac{1}{2}$. Celles-ci étant bien mieux calibrées, mes chiffres deviennent constants à 2 $\frac{0}{10}$ près, et le diamètre du fond étant un peu plus grand les rendements sont un peu plus élevés (chiffres extrêmes d'un grand nombre d'essais : 4,60 et 4,79, soit une moyenne de 4,70).

Revenons donc à l'expérience précédente. Elle nous montre qu'il faut chercher au-dessous du dixième de milligr. pour établir la courbe d'accroissement due à l'introduction du zinc et qu'il n'y a pas à proprement parler de dose optima mais une zone optima. De là deux séries d'expériences avec des doses de zinc d'une part inférieures à 0 gr. 0001, d'autre part supérieures à 0,0025.

Première expérience (en matras de deux litres).

Zinc introduit dans 250 cc.	Dilution 1 part. de zinc dans	Poids sec d' <i>Aspergillus</i> obtenu	Quantité de sucre restant
0 milligr.		1,65	7
0 — 01	25.000.000	2,75	5
0 — 02		2,98	4
0 — 03		4,22	1,45
0 — 04		4,30	1,40
0 — 05	5.000.000	4,41	0,97
0 — 06		4,54	0,70
0 — 07		4,60	»
0 — 08		4,30	»
0 — 09		4,10	0,87
0 — 10	2.500.000	4,43	0,65

Nous voyons nettement ici l'accroissement en poids suivre l'accroissement du taux en zinc. Mais dès trois centièmes de milligr., la Mucédinée atteint son poids ma-

ximum. Je recopie les observations faites pendant les quatre journées qu'a duré cette expérience.

23 octobre, à midi. — Mise au thermostat à 33°,5.

24 octobre, à midi. — Les cultures débutent dans tous les matras, les mycéliums recouvrent à peu près entièrement la surface des liquides nutritifs.

25 octobre, midi. — Les mycéliums recouvrent toute la surface des milieux. Début de noircissement dans les témoins (1), début également de noircissement mais avec moins d'intensité dans les matras 1 et 2 (c'est-à-dire ceux qui renferment 0 milligr. 01 et 0,02 de zinc).

26 octobre, midi. — Les mycéliums s'épaississent partout, à peine dans les témoins, peu dans 1 et 2, beaucoup dans les autres. Le noircissement s'accroît dans les témoins et dans 1 et 2 ; la surface est encore blanche dans les autres.

27 octobre, midi. — Les témoins sont entièrement noirs, 1 et 2 le sont notablement moins. Les autres sont sporulés à la périphérie surtout. Arrêt de l'expérience.

Deuxième expérience (en matras de 2 litres).

En multipliant les doses inférieures à 3/100 de milligr., le phénomène apparaîtra plus nettement encore et on appréciera toute sa délicatesse ; c'est ce que montre l'expérience ci-dessous :

Zinc introduit dans 250 cc. de milieu	Dilution 1 part. de zinc dans	<i>Aspergillus</i> obtenu	Sucre restant	Pour cent de sucre consommé
0 milligr.	—	1,91	6,93	41
0 — 005	50.000.000	2,53	5,57	52
0 — 010		2,81	5,05	57
0 — 015		3,20	4,44	62
0 — 020		3,63	3,10	73
0 — 025	10.000.000	4,45	1,30	80

(1) Il y avait généralement deux témoins dans mes expériences ; en pareille circonstance, pour ne pas surcharger de chiffres les tableaux, je donne les moyennes.

Observations faites :

20 novembre, 1 h. 3/4. — Mise au thermostat.

21 novembre. — A la dix-huitième heure, le témoin présente quelques spores. A la vingt-quatrième, 1 et 2 aussi.

22 novembre. — Le témoin et les matras 1 et 2 noircissent progressivement, 3 débute.

23 novembre. — Témoin, matras 1, 2 et 3 sont noirs, 4 débute.

24 novembre. — Les 5 cultures sont couvertes de spores, 4 et 5 notablement moins.

Ainsi, en faisant croître les doses de zinc par *cinq millièmes de milligr.*, on assiste à une augmentation progressive du poids des récoltes, à un accroissement concomitant de la consommation du sucre, à un retard du phénomène de sporulation que l'on peut suivre, presque heure par heure, et qui est d'autant plus manifeste qu'il y a plus de zinc. Avec *cinq millièmes de milligr.* seulement, la récolte s'est trouvée accrue de 0 gr. 62, c'est-à-dire que le zinc a déterminé la construction d'un poids de Mucédinée 124.000 fois supérieur au sien. Avec *vingt-cinq millièmes de milligramme*, la récolte s'est accrue de 2 gr. 54, c'est-à-dire que le zinc a déterminé la construction d'un poids de Mucédinée plus de 100.000 fois supérieur au sien, et, grâce à cette dose, l'*Aspergillus* a atteint son poids maximum.

L'*Aspergillus* utilise ainsi le zinc qui se trouve dans son milieu de culture à l'énorme dilution de 1/50.000.000 et il lui suffit d'en avoir à sa disposition 1/10.000.000 pour épuiser tout son sucre et acquérir tout son développement. Nous sommes loin de la dose nécessaire de 1/100.000 indiquée par RAULIN et du coefficient d'utilité spécifique du zinc donné par lui comme égal à 953.

On peut vraiment dire qu'on a dans l'*Aspergillus* un

réactif du zinc, réactif singulièrement sensible et précis, puisqu'il décèle le *cinquante millionnième* de métal et qu'il permet de faire de véritables dosages au *demi centième de milligramme*. Je ne connais pour ma part aucune méthode physique ou chimique qui atteigne à la sensibilité de celle-ci et, parmi les méthodes biologiques, je n'en connais qu'une, celle qui, avec de la laccase rigoureusement privée de manganèse, permettrait de retrouver ce métal à l'incroyable dilution de 1/250.000.000.

Et c'est ici qu'il me paraît utile d'interpréter les résultats obtenus par M. COUPIN. A son insu, M. COUPIN introduisait du zinc. Était-ce par l'eau, par le verre du matras, par le sucre, par les sels ? Très probablement par les sels. Et il a suffi qu'il en introduisît par l'une de ces voies deux à trois centièmes de milligramme pour laisser passer le phénomène inaperçu. La chimie était impuissante à les retrouver, l'*Aspergillus* les a décelés.

..

Nous n'avons pas fini d'établir la courbe d'action du zinc sur l'*Aspergillus*. Il nous faut étudier celle-ci pour les doses de zinc supérieures à 2 milligr. 5, dose la plus haute que nous ayons examinée jusqu'ici.

L'expérience montre qu'au-delà de la dose de 2 milligr. 5 pour 250 centimètres cubes (dilution 1/100.000) la zone optima se poursuit assez longtemps. Il n'y a chute dans le poids des récoltes qu'à partir de 25 milligr., c'est-à-dire pour une dilution de 1/10.000, puis elle se précipite. D'après KANTER (1), les spores ne se développent plus au-dessus d'une teneur de sulfate de zinc supérieure à 0 gr. 75⁰/₀. Je n'ai pas approfondi l'action, au reste moins intéressante à mon point de vue, des doses fortes. Voici un essai

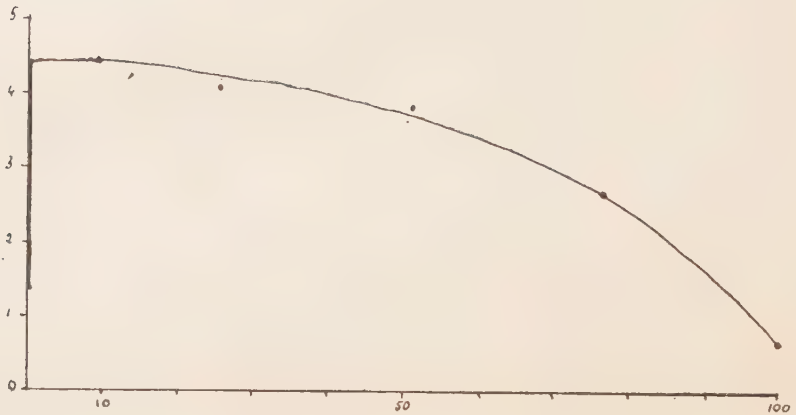
(1) Dissertation. St-Petersbourg, 1903.

dans lequel les doses de zinc ont varié depuis 1 milligr. jusqu'à 100 milligr. Cet essai, comme les précédents, a été arrêté au 4^e jour.

N ^{os}	Zinc introduit	Dilution	Poid des récoltes	Sucre restant
1	0 milligr.		1,62	7,10
2	1 —	250.000	4,47	1,50
3	2 — 5	100.000	4,47	1,30
4	5 —	50.000	4,52	0,80
5	8 —	31.250	4,30	1,10
6	10 —	25.000	4,52	0,80
7	25 —	10.000	3,95	1,40
8	50 —	5.000	3,74	1,72
9	75 —	3.333	2,60	5,20
10	100 —	2.500	0,60	10,25

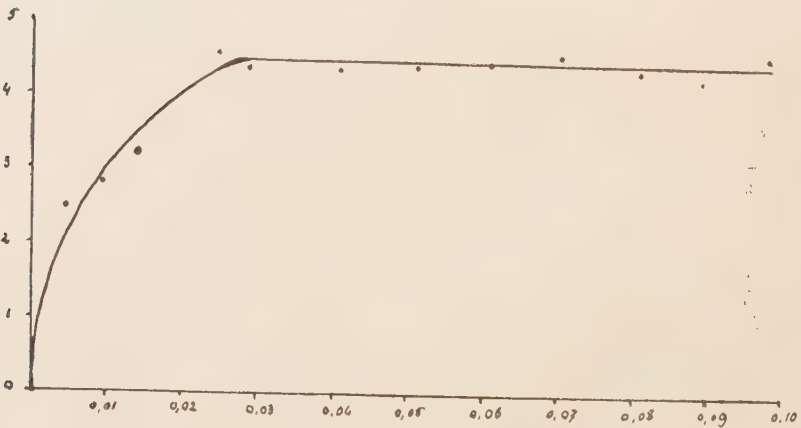
La 7^{me} culture et les suivantes ont débuté avec un très notable retard sur les premières ; au bout de vingt-quatre heures aucun développement n'apparaissait encore dans 9 et 10 ; il n'a débuté que vers la 48^e heure. A la fin du 4^e jour, le n^o 8 avait envahi toute la surface liquide ; le n^o 9 ne la recouvrait qu'incomplètement, le mycélium était dissocié en fragments incapables de se rejoindre ; le n^o 10 était réduit à quelques ilots. Les quatre dernières cultures n'avaient pas sporulé. J'ai examiné au microscope le mycélium n^o 8 ; il ne présentait pas de différence avec un mycélium normal au point de vue du diamètre des filaments mycéliens ; quelques-uns de ces filaments se bifurquaient ou se divisaient en trois branches courtes se terminant en cul de sac.

Nous sommes à même, maintenant, de traduire par une courbe l'action exercée par le zinc sur l'*Aspergillus*. Portons en abscisses les doses de zinc en milligrammes et en ordonnées les poids d'*Aspergillus* obtenus. Notre courbe prend l'allure que voici :



Construite à cette échelle, elle monte tellement vite qu'elle se confond au début avec la ligne des ordonnées, puis elle présente un plateau et une longue période de chute.

Construisons une deuxième courbe à une échelle cent fois plus grande, de façon à représenter le début de la courbe d'action. Voici ce que nous obtenons :



A vrai dire, dans la construction de cette courbe, je force un peu l'expérience, en ce sens que je la fais débiter à 0 pour une dose de zinc nulle, et je crois bien être plus près de la vérité en lui attribuant ce point de départ. Il est en effet permis de penser qu'en l'absence *absolue* de zinc, l'*Aspergillus* ne pousserait pas, si du moins la fonction que le zinc conditionne est une fonction essentielle, et il semble bien qu'elle le soit. Or, cette absence absolue de zinc est pratiquement irréalisable ; je ne puis me porter garant qu'il ne se glisse pas quelque part dans les milieux un ou deux millièmes de milligramme de zinc, la semence, bien que microscopique et impondérable, en peut apporter une petite réserve, même si elle a été prélevée dans les conditions que j'ai décrites. Enfin, on peut même dire que, *théoriquement*, il est impossible de se débarrasser du zinc. Peut-on faire que ce métal ne possède pas une certaine tension de vapeur si faible qu'on la suppose à la température ordinaire ? Je ne crois pas qu'il y ait exagération à tenir pareil langage. Le lecteur distinguera d'ailleurs facilement les faits expérimentalement établis des hypothèses que je crois juste de soutenir.

§ 4. Influence de la température et du temps.

Toutes les expériences relatées dans les pages qui précèdent ont été faites à la température de 34° qui est, comme on sait, bien proche de la température optima de l'*Aspergillus*. Il pouvait être avantageux de rechercher ce qui se passerait à des températures inférieures à celle-ci : ou bien le sens du phénomène resterait le même et le ralentissement de la végétation serait favorable à l'observation, ou bien le sens du phénomène subirait quelque variation intéressante à constater ; on sait en effet que les propriétés bio-chimiques des micro-organismes sont en relation avec les conditions physiques et entre autres avec la température. C'est la première hypothèse qui s'est réalisée.

Je consigne ci-dessous les résultats de deux expériences faites, l'une à 30°, l'autre à 25°.

1. — Expérience faite à 30° (fioles d'Erlenmeyer de 1 litre 1/2).

Zinc introduit	Poids d' <i>Aspergillus</i>	Sucre restant
0 milligr.	1,55	7,50
0 — 01	2,62	5,40
0 — 02	3,33	3,25
0 — 03	4,05	1,52
0 — 40	4,69	0,60

L'expérience a duré 4 jours. Au moment où les cultures ont été retirées du thermostat, le témoin était couvert de spores noires, les 4 autres cultures l'étaient beaucoup moins et inégalement.

2. — Expérience faite à 25° (fioles d'Erlenmeyer de 1 litre 1/2) :

Zinc introduit	Poids d' <i>Aspergillus</i>	Sucre restant
0 milligr.	1,53	8,30
0 — 01	2,52	6,30
0 — 02	3,08	4,90
0 — 03	3,47	4,10
0 — 40	3,85	3,46

L'expérience a duré 4 jours. A la fin de ce 4^{me} jour, la surface des cultures était presque entièrement blanche. Seule la surface du témoin était uniformément grise.

*
* *

Une autre question se pose, et tout à fait capitale. Le zinc nous est apparu comme un élément nécessaire, indispensable à la vie de l'*Aspergillus*. Mais nous avons limité jusqu'ici les observations à un temps relativement court, 4 jours, et il n'est pas démontré que le *Sterigmatocystis* privé de zinc après avoir montré une hâte très grande à former ses appareils de reproduction, ne soit pas apte à s'accroître en poids, à atteindre même le poids d'un *Sterig-*

matocystis cultivé en présence de zinc. Que répond l'expérience ?

Je prépare une série de fioles d'Erlenmeyer renfermant : la moitié d'entre elles du liquide de RAULIN sans zinc, l'autre moitié le même liquide avec 1 milligr. de zinc. Je stérilise. J'ensemence. Je mets au thermostat à 34°. Chaque jour, régulièrement, à partir du 3^{me}, je retire une fiole de chacune des deux séries, je détermine suivant la technique habituelle le poids sec de Mucédinée, je dose en même temps le total des substances dissoutes dans celui-ci en faisant l'extrait sec.

Voici les chiffres :

Poids secs de Mucédinée obtenus :

Après	Série sans zinc	Série avec zinc
67 h.	1 gr. 59	4,10
3 j.	2 — 27	4,82
4 j.	2 — 67	4,70
5 j.	3 — 05	3,60
6 j.	3 — 80	2,96
7 j.	3 — 64	2,69
8 j.	3 — 50	2,59
10 j.	3 — 40	»

Sucre restant dans les milieux de culture :

Après	Série sans zinc	Série avec zinc
67 h.	8,20	1,64
3 j.	6,15	0,75
4 j.	4,93	0,16
5 j.	3,12	0,07
6 j.	0,66	traces
7 j.	0,70	0
8 j.	0,72	0
10 j.	0,75	»

Extrait sec des liquides de culture :

Après	Série sans zinc	Série avec zinc
67 h.	9,01	2,29
3 j.	7,20	»
4 j.	6,10	»
5 j.	4,42	0,92
6 j.	1,89	»
7 j.	2,70	0,84
8 j.	2,22	»
10 j.	»	»

L'expérience parle clairement. Elle dit qu'en l'absence de zinc, l'*Aspergillus*, au bout de 3 et 4 jours, n'a pas atteint le poids qu'il est susceptible d'atteindre dans le même temps en présence de zinc, ce que nous savons déjà, mais en outre qu'au bout de 10 jours il n'a pu atteindre ce même poids. Il reste au moins stationnaire dès le 6^e, et, au-delà du 8^e jour, cet *Aspergillus*, qui a commencé à sporuler dès la 18^{me} heure, décroît même légèrement de poids. Il a encore à ce moment environ 2 grammes d'aliments à sa disposition, dont 0 gr. 70 de sucre qu'il ne peut consommer. L'*Aspergillus* pourvu de zinc a atteint son poids maximum entre le 3^e et le 4^e jour, a sporulé abondamment au 3^{me} jour, et, dès la fin du 4^{me}, a commencé à s'autolyser. Il n'y a plus dans le milieu que 0 gr. 80 environ de substances diverses et des traces de sucre dont il opère la combustion totale.

§ 5. Fixation du zinc par le *Sterigmatocystis*.

J'ai essayé de donner une démonstration précise de l'influence que le zinc exerce à dose extrêmement faible sur l'*Aspergillus* ; il semble maintenant indispensable d'aller plus loin dans l'analyse du phénomène et de découvrir le « comment » d'une action si singulière. C'est là une grosse question susceptible d'ouvrir de forts curieux horizons sur le mode d'activité des agents catalytiques. Je n'ai pas la

prétention de la résoudre d'emblée, mais il m'a semblé que ce serait déjà pénétrer plus avant dans l'analyse du phénomène qu'étudier comment l'*Aspergillus* se comporte, vis à vis de ce zinc qu'on lui offre, s'il le fixe ou s'il le délaisse, et, dans le cas où il le fixerait, dans quelle mesure se fait cette fixation.

A priori, il paraît très vraisemblable qu'il le fixe, c'est pourquoi les auteurs (1) l'ont généralement admis sans en attendre la preuve expérimentale.

L'expérience vérifie d'ailleurs cette prévision.

En possession d'une méthode analytique sensible et exacte, je l'ai appliquée à la recherche et au dosage du zinc dans des *Aspergillus* cultivés sur des milieux de richesse variable en zinc. Voici ce que j'ai trouvé :

Poids secs des Aspergillus	Quantité de zinc que renfer- mait le milieu	Dilution du zinc dans le milieu	Zinc retrouvé dans les Mycéliums	Proportion de zinc fixée
4 gr. 40	0 gr. 0005	500.000	0,0005	100
4 — 47	0 — 001	250.000	0,0012	100
4 — 27	0 — 003	83.333	0,0022	73,3
4 — 52	0 — 005	50.000	0,0037	74
4 — 30	0 — 008	31.250	0,0037	46,2
4 — 32	0 — 010	25.000	0,0039	39
3 — 95	0 — 025	10.000	0,0045	18
3 — 74	0 — 050	5.000	0,0056	11,2

L'examen de ces chiffres entraîne une série de remarques. Nous voyons d'abord le *Sterigmatocystis* fixer *tout* le zinc de son milieu de culture lorsque la quantité de métal est égale ou inférieure à 1 milligr. pour 250 centimètres cubes de milieu, c'est-à-dire pour une dilution de 1/250.000 ou une dilution supérieure.

Tout le zinc, disons-nous ? Mais alors nous avons en main une méthode élégante pour éliminer le zinc d'un milieu où il se rencontre seulement à l'état de trace. Cette

(1) DUCLAUX, in Traité de Microbiologie, T. I.

BOURQUELOT, in Dict. de Physiologie de Richet, art. Champignons.

méthode consiste à faire végéter un mycélium d'*Aspergillus* à la surface de ce milieu. La moisissure fixera tout le zinc et le liquide sera privé de ce métal.

Ilâtons-nous de mettre à profit cette observation. Peut-être nous permettra-t-elle de voir baisser encore le rendement d'une récolte d'*Aspergillus* en l'absence de zinc.

Je fais l'expérience suivante : Une fiole d'Erlenmeyer d'un litre et demi, contient 250 centimètres cubes de liquide de Raulin, moins le sulfate de zinc. Je stérilise et j'ensemence comme d'habitude. Je mets au thermostat à 35°. Au bout de 3 jours et demi je retire aseptiquement au moyen d'une pipette stérile le liquide de culture, je le répartiss dans deux parties égales dans deux fioles coniques stérilisées.

Dans l'une de ces fioles (A) j'ajoute deux centièmes de milligramme de zinc. J'ensemence, je mets au thermostat, voici ce que j'observe :

Après douze heures : rien nulle part.

Après vingt-quatre heures : début de culture dans le matras sans zinc (B), début à peine sensible dans l'autre (A).

Après trente six heures : début de culture dans A. Je retrouve nettement ici une observation de M. COUPIN : Le retard apporté à la végétation par la présence du zinc et il est juste de la souligner. Il faut observer aussi que le départ de la culture sans zinc a été bien plus long que d'habitude, mais il ne faut pas oublier que le milieu actuel est relativement peu nutritif ; il ne renferme guère que la moitié du sucre du milieu normal, et il renferme très certainement des substances secrétées par le premier mycélium.

Après trois jours, la sporulation débute dans B ; A prospère et reste complètement blanc.

Après cinq jours, B est entièrement couvert de spores. A est encore blanc.

L'expérience est arrêtée à 5 jours 1/2. A commence à sporuler. Les mycéliums sont recueillis, séchés, pesés comme d'habitude.

On trouve :

Mycélium sans zinc (B) = 0,340

Mycélium avec zinc (A) = 1,290

$$\frac{1,29}{0,34} = 3,8$$

Le liquide de culture B renferme encore une proportion notable de sucre réducteur. Le liquide A n'en renferme que des traces.

Ainsi j'ai augmenté le rapport des poids de quelques dixièmes, moins en vérité que je ne l'espérais. Le fait n'en est pas moins très démonstratif.

Avec un milieu insuffisamment nutritif, M. COUPIN observe que le zinc tue le *Sterigmatocystis*. Nous avons ici un milieu insuffisamment nutritif, et le zinc non seulement n'a pas tué la plante, mais a multiplié la récolte par un coefficient supérieur au coefficient habituel. Ceci est une question de dose de zinc. A la dose de 1/6.000.000 (0 gr. 00002 dans 120 c.c.), il a été utile ; à celle de 1/100.000 il eut été toxique. C'est dire que la dose utile ou la dose toxique ne sauraient s'exprimer par des chiffres absolus, elles sont variables avec les conditions d'alimentation.

Mais revenons au phénomène de la fixation du zinc par le *Sterigmatocystis*.

S'il fixe tout le zinc de son milieu lorsque, dans les conditions expérimentales où je me suis placé, la quantité de ce métal ne dépasse pas un milligramme, il l'abandonne au contraire partiellement lorsque le taux du zinc est plus élevé. C'est ce que montre le tableau pour les doses de 3, 5, 8, 10, 25, 100 milligrammes, et l'on voit, fait facile à prévoir, que la proportion de zinc abandonnée, est d'autant plus grande, et par suite la proportion de zinc fixée est d'autant plus petite, que la quantité du métal dans le milieu est plus élevée. Les chiffres de la 5^e colonne indiquent pour cent cette proportionnalité. Ainsi dans un mycélium ayant vécu en présence de 10 milligrammes de

zinc, je n'ai retrouvé que 3 milligr. 9 de métal (quantité fixée 39 $\frac{0}{0}$) et la différence, 6 milligr. 1, était abandonnée dans le milieu où l'analyse m'a permis de la retrouver intégralement.

Ce n'est pas tout. En présence d'une quantité de zinc supérieure à 10 milligrammes, c'est-à-dire pour une dilution inférieure au vingt-cinq millième, la mucédinée commence à se trouver atteinte dans sa vitalité, les poids de récoltent baissent. A ce moment la quantité de zinc que la plante fixe franchit 4 milligrammes, cette dernière dose

$\frac{1}{1.100}$ environ du poids de la moisissure — est la dose maxima que le *Sterigmatocystis* puisse fixer sans dommage pour lui.

Cette étude nous a donc fait faire un pas en avant. Elle complète la précédente étude en nous permettant de distinguer dans les relations de l'*Aspergillus* avec le zinc cinq circonstances :

La moisissure n'a-t-elle pas la moindre trace de zinc à sa disposition ? Même abondamment pourvue de tous autres aliments, aliment hydrocarboné, phosphore, soufre, potassium, magnésium, oxygène libre, etc., elle ne pousse pas (1) ou ne mène qu'une existence chétive.

Trouve-t-elle dans son milieu des traces de zinc extrêmement petites, n'atteignant pas le dix millionième, elle va se développer, fixer tout ce zinc qui lui est rigoureusement « nécessaire », et elle croîtra d'autant mieux que la dose de zinc se rapprochera davantage du dix millionième.

En présence de cette dernière dose, elle atteint son poids maximum ; le zinc ne représente alors que le $\frac{1}{174.000}$ environ du poids de la moisissure complètement développée.

(1) Ceci est un peu théorique ; j'ai fait antérieurement les réserves utiles.

L'*Aspergillus* a-t-il plus de zinc encore à sa disposition — soit des quantités comprises entre 1/10.000.000 et 1/250.000 de son milieu de culture, — il va, comme tout à l'heure, atteindre son poids maximum et fixer tout le zinc qu'on lui offre. Comment désignerai-je ces doses qui dépassent la dose rigoureusement nécessaire mais qui ne sont pas nuisibles, puisque la plante, loin d'en souffrir, absorbe tout. Elles ont leur utilité sans doute. Je le laisserai à penser en les désignant sous le nom de « *doses utiles* » (2).

Voici un nouveau cas : la dose de zinc va du deux cent cinquante millième au vingt-cinq millième ; l'*Aspergillus* végète normalement, mais ne fixe qu'une fraction du zinc. Il y a un *excès* de ce corps, puisque la plante n'en fixe qu'une partie ; mais cet excès n'est pas nuisible, il est « *indifférent* ».

Enfin, la dose du zinc dépasse-t-elle le vingt cinq millième ? La Mucédinée faiblit, elle n'atteint plus son poids normal. Ici débutent les *doses toxiques*.

Je résume :

QUANTITÉS DE ZINC dans le milieu		POIDS de la moisissure	FIXATION du zinc
Pas du tout.....	pas de développement ou extrêmement faible.		
Moins de 1/10.000.000	doses nécessaires	de plus en plus grand	totale.
1/10.000.000		atteint le maximum	totale.
de 1/10.000.000	doses utiles	poids maximum	totale.
à 1/250.000			
de 1/250.000	excès indifférent	id.	partielle.
à 1/25.000			
Plus de 1/25.000	doses toxiques	s'abaisse progressivem.	partielle.

D'autres questions se posent.

Sous quelle forme ce zinc persiste-t-il dans la moisissure ? Minérale ou organique ? Où se localise-t-il ? Quelle fonction biologique importante conditionne-t-il ? Entre-t-il

(2) Peut-être vaudrait-il mieux dire : doses complètement utilisables.

dans quelque complexe diastasique ? Pour l'instant, je laisse ces questions sans réponse. Il faut assurer ses pas, et n'avancer que par étapes. La comparaison de ce qui se passe ici et de ce qui se passe ailleurs, chez des végétaux différents par la structure et les fonctions bio-chimiques, peut être instructive. Essayons de faire cette comparaison.

CHAPITRE II.

Zinc et levures.

Parmi les Cryptogames, les levures vont se prêter facilement à cette comparaison. Encore faut-il que nous fassions un choix parmi ces *Saccharomyces*, car il en existe de nombreuses espèces et de nombreuses races ; leurs besoins en oxygène ne sont pas les mêmes et si nous voulons établir une comparaison entre l'*Aspergillus*, espèce essentiellement aérobie et la levure, il faut que nous prenions d'abord un type de levure vivant volontiers en surface, de telle sorte que chez elle le végétal l'emporte sur le ferment. Il n'en sera que plus intéressant d'examiner ensuite quelle influence le zinc exerce sur la levure ferment.

Bien que les travaux relatifs à l'action des sels et des antiseptiques sur la levure soient extrêmement nombreux, il n'en est pas, à ma connaissance, où, à propos de l'action du zinc, les auteurs se soient préoccupés de séparer nettement l'action de ce corps sur la levure-végétal et la levure-ferment. Or, la manière d'être de la levure est, dans ses deux modes de vie, bien différente puisque dans le premier elle se multiplie activement et brûle complètement le sucre de son milieu, tandis que dans le second elle se multiplie peu et intervient surtout par sa sécrétion de zymase pour décomposer le sucre en alcool et anhydride carbonique. La levure a, comme végétal, ses antiseptiques et ses corps favorisants ; elle a, comme ferment, des paralynants et des accélérateurs de sa zymase et il n'est pas certain que l'action de telle substance envisagée soit du

même ordre ou même de même sens dans les deux circonstances. D'autre part, les actions que j'étudie ici sont celles des très petites doses et par ce côté le problème n'a pas été abordé.

§ 1. Action du zinc sur la levure-végétal.

La levure étudiée est une levure de Château-Latour (Bordelais), qui se développe facilement en voile et dont je dois une culture pure à l'obligeance de M. KAYSER.

Il faut d'abord faire choix d'un milieu de culture. Ce milieu devra nécessairement être artificiel pour que nous sachions exactement dans quelles conditions nous opérons. Ce milieu sera très rigoureusement privé de zinc et il faudra pour cela prendre le luxe de précautions indiqué dans les expériences sur l'*Aspergillus* et utiliser les mêmes moyens de contrôle.

Malheureusement il n'a pas été fait pour la levure un travail d'ensemble comparable à celui de RAULIN, pour l'*Aspergillus*, et l'établissement de la formule optimale, c'est-à-dire de la formule, qui, pour la levure-végétal, donnerait le maximum de rendement dans un temps donné constituerait déjà un travail de longue haleine. Sans entreprendre ce travail, je me suis efforcé d'utiliser un milieu renfermant, en dehors des éléments strictement nécessaires, des éléments tels que le manganèse, dont les recherches de MM. KAYSER et MARCHAND ont récemment montré l'utilité. La formule utilisée diffère donc des formules actuelles en ce qu'elle est d'une part plus complexe que celle de LAURENT, de DUCLAUX, de KAYSER, d'autre part en ce que le taux de tous les éléments en est mieux fixé que dans les formules de PASTEUR ou de COHN qui employaient les cendres de levure, de THOMAS qui introduisait avec l'eau ordinaire des traces d'éléments en quantité inconnue. L'azote est sous forme ammoniacale.

Cette formule, d'ailleurs sujette à révision, qui convient surtout à la levure-végétal, est la suivante :

Phosphate monopotassique	7 g. 50
Tartrate d'ammoniaque.....	5 »
Sulfate de magnésie.....	0 50
Sulfate de calcium.....	0 25
Chlorure de sodium.....	0 05
Sulfate ferreux ammoniacal.....	0 025
Silicate de potasse.....	0 025
Sulfate de manganèse.....	0 025
Alun de potasse.....	0 025
Saccharose.....	150
Eau distillée.....	Q. S. pour 1000 c. c.

On prépare ce milieu de culture et on le répartit par 250 centimètres-cubes dans des fioles coniques d'Erlenmeyer de 1 litre 1/2. On ajoute le sulfate de zinc dans les fioles qui en doivent contenir, on stérilise à l'autoclave par chauffage à 115° pendant une demi-heure ; le milieu reste parfaitement limpide, il se colore très légèrement. L'ensemencement se fait en partant d'une culture antérieure faite en milieu artificiel privé de zinc. Cet ensemencement peut être fait largement au moyen d'une petite pipette stérilisée et jaugée, ou parcimonieusement au moyen de la boucle de platine. Inutile de dire que l'ensemencement doit être fait dans les mêmes conditions pour la série des cultures à comparer. Cette question de la quantité de levure à ensemeriser est loin d'être indifférente. Elle touche à une question longtemps controversée et qui ne me paraît pas avoir reçu jusqu'ici une solution satisfaisante. PASTEUR a montré qu'en ensemençant une trace de levure dans un milieu de culture ne renfermant en dehors du sucre que des matières minérales, la levure se développe et provoque une fermentation alcoolique régulière. LIEBIG affirmait n'avoir jamais pu réaliser cette expérience. D'après WILDIERS, pour que la levure se développe et provoque la fermentation, il faut qu'elle trouve dans le milieu une trace d'une substance hypothétique qu'il dési-

gne sous le nom de « bios », et il explique le différend entre PASTEUR et LIEBIG, en admettant que PASTEUR, faisant un ensemencement un peu plus large que LIEBIG, introduisait avec le liquide imprégnant la levure une quantité suffisante de ce « bios ». Si l'on en croit des expériences récentes de DEVLOO, ce corps serait une base monoazotée entrant comme noyau fondamental dans un corps gras phosphoré analogue à la lécithine.

Je n'ai pas l'intention d'entrer pour aujourd'hui dans cette discussion, je me borne à la rappeler ici, et je constate que l'ensemencement, même fait avec la seule boucle de platine, ne m'a jamais donné de déboires.

Les milieux étant ensemencés, on les porte à l'étuve à 25°, on les y maintient un temps convenable, 5, 8, 15 jours, on note jour par jour l'aspect des cultures. Les vases sont retirés de l'étuve et l'on dose la quantité de sucre consommé et le poids de levure formé. Le sucre consommé est donné par la différence entre la quantité de sucre initiale et la quantité de sucre restant dans le milieu appréciée par dosage d'après la technique de G. BERTRAND. Pour apprécier le poids de levure, plusieurs moyens peuvent être employés : séparer d'abord la levure du liquide par centrifugation, ce qui abrège singulièrement les opérations, puis jeter le reste sur un filtre taré, laver la levure recueillie avec une quantité connue et constante d'eau distillée, dessécher, peser et déduire le poids du filtre. Il y a dans cette opération un temps un peu dangereux, c'est celui du lavage. La cellule de levure se plasmolyse facilement. On peut éviter ce lavage et opérer de la façon suivante : la levure étant recueillie sur le filtre, laisser égoutter, peser humides filtre et contenu, les peser après dessiccation, déduire le poids sec du filtre, déduire le poids des substances dissoutes dans le poids d'eau qui imprégnait la levure. Il n'y a d'ailleurs pas trop à redouter les très petites erreurs susceptibles d'être commises

dans cette manipulation ; les différences de poids observées sont d'un ordre de grandeur tel qu'elles excluent toute interprétation contestable.

Voici les résultats :

Expérience I.

Elle a été faite sur un petit volume de milieu de culture (50 c. c.).

Le milieu A ne renferme pas de zinc. Le milieu B renferme 1 centième de milligr. de zinc (dilution 1/5.000.000).

L'ensemencement a été fait largement (environ 3 milligr. de levure).

L'expérience dure 8 jours. On trouve :

A	0,197 de levure.
B	0,278 —
B/A	= 1,4
B-A	= 0,081

Coefficient d'utilité du zinc = 8,100

Expérience II.

Milieux de 250 c. c. en fioles d'Erlenmeyer d'un litre 1/2.

A ne renferme pas de zinc.

B contient 1/1.000.000 de zinc soit 25 centièmes de milligr.

L'ensemencement est fait avec une pipette fine (poids de levureensemencé environ 5 milligr.).

La culture additionnée de zinc présente 24 heures après l'ensemencement un voile blanc uniforme ; le développement est beaucoup moins avancé dans la culture A qui présente des îlots blancs. La différence s'atténue, mais reste nette les jours suivants. Au cinquième jour, quand on met fin à l'expérience, le témoin présente un voile uniforme et mince. Grand B un voile plus épais à surface

ridée. Ces voiles sont d'ailleurs peu cohérents et se dissolvent par la moindre agitation.

Le pesée de la levure donne les résultats suivants :

A	0 gr. 315	B	0 gr. 961
---	-----------	---	-----------

Le dosage du sucre restant :

A	33,80	B	26,75
---	-------	---	-------

Le calcul donne pour le sucre consommé :

A	5,20	B	12,25
---	------	---	-------

Grâce à l'addition de 1/1.000.000 de zinc, il s'est formé un supplément de poids de levure égal à 0,646. La récolte a été multipliée par 3. Le coefficient d'utilité du zinc se chiffre ici par le nombre 2500.

Expérience III.

Milieux de 250 c. c. en fioles d'Erlenmeyer de 1 litre 1/2.
2 fioles A sans zinc.

2 fioles B renferment 1/1.000.000 de zinc (0 gr. 00025).

L'expérience a duré 14 jours.

A	0,925	A'	1,021
B	2,402	B'	2,133
B/A	2,27	B'/A'	2,09
B — A =	1,77	B' — A'	1,112

Coefficient d'utilité du zinc, 4700 et 4748

Sucre restant :

A	25,55	A'	24,90
B	9,80	B'	8,50

Sucre consommé :

A	13,80	A'	14,45
B	29,55	B'	30,85

Expérience IV.

Milieux de 250 c. c. Le numéro 1 ne renferme pas de zinc.

Le numéro 2 renferme 0,000025 de zinc (dilution 1/10.000.000)

— 3 —	0,00025	— —	1/1.000.000
— 4 —	0,0025	— —	1/100.000
— 5 —	0,025	— —	1/10.000
— 6 —	0,050	— —	1/5.000
— 7 —	0,100	— —	1/2.500
— 8 —	0,250	— —	1/1.000

L'expérience a duré 5 jours.

Numéro	Poids de levure	Sucre consommé
1.....	0,322	5,2
2.....	0,350	3,8
3.....	0,968	12,25
4.....	0,987	18,50
5.....	1,483	19
6.....	0,938 (?)	21
7.....	1,300	» »
8.....	1,240	» »

Pour un taux de zinc supérieur à 1/1000, le départ des cultures se fait avec un retard d'autant plus grand qu'il y a plus de zinc, mais la levure supporte très facilement des doses élevées de métal. Elle végète encore sur un liquide à 4/1000 de zinc, c'est-à-dire renfermant 17 gr. 57 de sulfate de zinc cristallisé par litre.

Entre ces expériences et celles qui ont trait à l'action du zinc sur l'*Aspergillus*, le parallélisme est évident. De petites doses de zinc augmentent les récoltes de levure comme elles augmentent les récoltes de moisissure. Elles multiplient les rendements par 3 et même par 4. Mais ici, il faut, pour atteindre à ces résultats, des doses de zinc plus élevées qu'avec le *Sterigmatocystis*. 1/10.000.000 de zinc ne produit ici qu'un effet peu marqué; d'autre part, la levure expérimentée résiste singulièrement aux doses

fortes ; on obtient encore des cultures très prospères avec 1/1000 de zinc, tandis que l'*Aspergillus* est incapable de pousser dans un milieu d'une telle concentration en zinc.

Supposons que nous ensemencions simultanément dans un milieu approprié de l'*Aspergillus niger* et notre *Saccharomyces* ; si le taux en zinc de notre milieu est extrêmement petit, nous verrons l'*Aspergillus* se développer vigoureusement, envahir la surface et étouffer notre levure. Le taux du zinc dans le milieu est-il, au contraire, relativement grand, 1/2000 ou 1/1000, notre levure prospérera, tandis que l'*Aspergillus* n'émettra que quelques filaments mycéliens. Ce sera réalisé en petit ce qui se réalise en grand dans la nature. Notre levure nous apparaîtra comme une plante « calaminaire » par rapport à l'*Aspergillus*, et nous saisirons sur le vif une des causes actives de répartition des espèces à la surface du sol.

*
* *

Notre levure fixe le zinc de son milieu de culture. C'est ainsi que dans 1 gr. 536 d'une levure qui avait vécu en surface sur un milieu renfermant 5 milligr. de zinc, j'en ai retrouvé près de 1 milligr. (exactement 0 milligr. 93). Je n'ai d'ailleurs pas fait ici une série de dosages systématiques comme dans le cas de l'*Aspergillus*. Au reste, ces phénomènes de fixation des sels par la levure sont connus depuis longtemps. MANN, POTTEVIN l'ont démontré pour le sulfate de cuivre et même, d'après le premier auteur, il ne s'agirait pas là d'une réaction vitale, le phénomène se passerait de même avec la levure morte et serait comparable à un phénomène de teinture. Il me semble que c'est un fait à revoir.

Cette fixation de zinc ne va pas sans modification de forme de la cellule de levure. Le *Saccharomyces* très aérobie qui m'a servi ici végète facilement en voile à la surface de ses milieux où il se présente au microscope comme

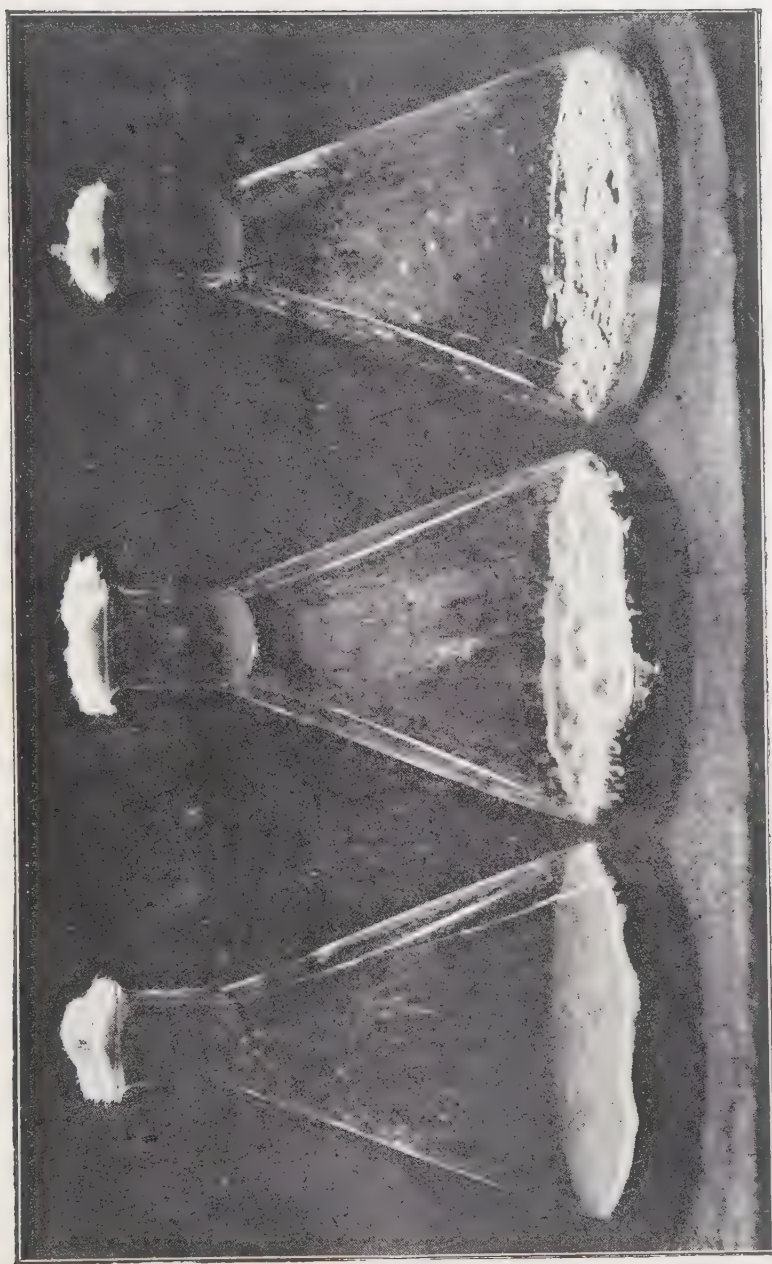


PLANCHE I

Cultures d'*Aspergillus* sur liquide de Raulin :

- a) Privé de zinc.
 b) Renfermant $\frac{1}{5,000,000}$ de zinc
 c) renfermant $\frac{1}{5,000}$ de zinc.

formé de cellules très allongées, parfois filiformes, mélangées d'un petit nombre de cellules rondes et ovales. Si ces milieux renferment des traces de zinc, on voit les éléments allongés diminuer de nombre, les cellules ovalaires ou rondes devenant d'autant plus nombreuses que le taux de zinc s'élève davantage. Lorsqu'on arrive aux doses nuisibles, on ne trouve plus que des cellules assez régulièrement rondes.

§ 2. Action du zinc sur la levure-ferment.

Nous n'avons pas le droit d'étendre a priori à une levure vivant en profondeur, les conclusions qui se dégagent de la précédente étude. La levure-ferment, comme je l'ai rappelé au début de ce chapitre, fonctionne comme organisme sécréteur de zymase, et c'est assurément l'influence sur cette zymase de la substance chimique étudiée, qui, ici, dominera la scène.

L'action du zinc sur la fermentation alcoolique a d'ailleurs été examinée par divers auteurs.

DUMAS (1), à qui l'on doit une importante étude de l'action qu'exercent de nombreux sels sur la fermentation, opérait de la façon suivante : il mettait de la levure de bière en contact avec une solution saturée de sel, 30 à 40 centimètres cubes de solution pour 1 gr. de levure ; trois jours après, il décantait le liquide et le remplaçait par un même volume de solution sucrée ; il constatait alors comment cette levure se comporte comparativement avec une levure non traitée. En opérant ainsi, il a groupé les sels en quatre catégories :

1° Ceux qui permettent à la fermentation de s'accomplir jusqu'au bout, ou même la favorisent.

2° Ceux qui la retardent et la laissent incomplète.

(1) DUMAS. Recherches sur la fermentation alcoolique. *C. R. Acad. des Sc.*, LXXV, 277 (1872).

3° Ceux qui l'empêchent tout en permettant l'intervention du sucre.

4° Ceux qui empêchent la fermentation et même l'intervention.

Le sulfate de zinc figure dans le tableau de DUMAS dans la première catégorie.

Plus récemment, MM. NATHAN, A. SCHMID et W. FUCHS (1) ont examiné l'influence de divers métaux sur les moûts en fermentation.

Ils opèrent de la façon suivante : Dans une série de matras d'une capacité de un litre, ils introduisent 800 centimètres cubes de moût, et ils y plongent trois cylindres métalliques bien dégraissés. Ils ferment les récipients à l'aide d'un tampon de coton et stérilisent. Après refroidissement et aération, ils ensemencent. Ils déterminent la différence entre le poids des matras avant et après fermentation, c'est-à-dire la quantité d'anhydride carbonique dégagée et la diminution de poids des cylindres métalliques. Dans une première série d'expériences faites avec du moût de pomme, ils trouvent que, dans une fermentation normale, la perte d'anhydride carbonique étant de 32 à 34 grammes par ballon, celle-ci tombe à 9,45 en présence de zinc, tandis qu'elle tombe à 11,9 seulement pour le cuivre, à 26 gr. 4 avec le plomb, à 30 gr. 8 avec l'étain.

Dans une deuxième série d'expériences faites sur du moût de bière, ils trouvent que, quels que soient les matériaux en expérience, l'influence toxique ne s'exerce pas de la même manière ; la quantité d'anhydride carbonique dégagée est sensiblement la même lorsque la fermentation est terminée. Ils s'appuient sur d'autres considérations pour conclure que le zinc est (ainsi que le fer, l'étain, le bronze, le plomb, le laiton, l'aluminium) un poison violent pour la levure. Il n'y a pas à s'arrêter plus longtemps

(1) L. NATHAN, A. SCHMID et W. FUCHS. *Centralblatt f. Bakt.*, 1^{re} P., p. 93 (1904), pp. 289, 349 (1905).

sur ces expériences qui me paraissent dominées surtout par le souci de conclure que l'appareil construit par les auteurs pour la fabrication de la bière, appareil en verre sans joint métallique, est supérieur à tout autre.

Mes expériences ont été faites avec une levure de Saint-Gilles (Gard) (1). Pour rendre les essais comparables, on a employé le même milieu minéral que précédemment. Les matras étaient additionnés de doses croissantes de zinc depuis 1/10.000.000 jusqu'à 1/10.000. L'ensemencement était fait uniformément avec cinq gouttes d'une culture pure faite en milieu privé de zinc. Les fermentations traînaient un peu en longueur ; la formule du milieu employé, très favorable à la levure-végétal, l'est évidemment beaucoup moins à la levure-ferment.

Voici trois expériences arrêtées à des stades plus ou moins avancés de la fermentation :

Expérience I.

Quantité de zinc	Dilution du zinc	Sucre consommé	Alcool 0/0	Poids de levure
0 milligr.	0	7,80	3,5	»
0,05	1/10.000.000	7,75	3,5	»
0,10	1/5.000.000	7,75	3,5	»
0,20	1/2.500.000	7,5	3,3	»

Expérience II.

0 milligr.	0	11,60	5,3	0,389
0,5	1/1.000.000	11,05	5	0,349
1	1/500.000	11,60	5,3	0,379
5	1/100.000	11	5	0,356

Expérience III.

0 milligr.	»	7,50	3,4	»
0,05	1/10.000.000	7,20	3,3	»
0,5	1/1.000.000	7,25	3,3	»
0,5	1/100.000	7,75	3,5	»
50	1/10.000	7,47	3,4	»

(1) Comme la précédente, elle m'a été obligeamment fournie par M. KAYSER.

Ces expériences montrent, qu'aux doses expérimentées, le zinc ne produit aucune action appréciable sur la fermentation. A ces mêmes doses, nous avons vu le zinc augmenter d'une très remarquable façon les rendements de levure et l'opposition entre les deux faits me paraît très démonstrative.

CHAPITRE III.

Zinc et plantes Phanérogames.

§ 1. Historique des recherches antérieures.

De nombreux travaux ont trait à l'influence que les combinaisons du zinc exercent sur les plantes vertes. La plupart de ces travaux sont nés de préoccupations d'ordre pratique ; ils ont eu généralement pour origine des observations de pratique agricole dans des régions zincifères ; les auteurs se sont surtout proposés pour but de déterminer, si les sels de zinc sont fixés par le sol, s'ils pénètrent dans les plantes et leur sont nuisibles.

Un des premiers, KNOP (1) s'est demandé si, en présence de chaux et d'oxyde de zinc, les plantes absorbent indifféremment l'un et l'autre oxyde dans la proportion où ils se trouvent mélangés, ou si, choisissant leur élément, elles absorbent la chaux d'abord, puis, quand celle-ci vient à manquer, l'oxyde de zinc. Bien que les essais de KNOP laissent quelque peu à désirer et qu'il n'ait pu reconnaître avec une entière certitude le passage du zinc dans ses plantes, il conclut pourtant que « l'absorption du zinc et son action toxique peuvent être considérés comme sûrement démontrés ».

En 1763, GORUP-BESANEZ (2) fait vivre diverses plantes dans de la terre prélevée dans le jardin de l'Université d'Erlangen, placée dans de petites caissettes de bois et

(1) KNOP. *Landwirth. Vers-Stat.*, I, 9 (1860).

(2) GORUP-BESANEZ. Ueber das Verhalten der vegetirenden Pflanze und der Ackererde gegen Metallgifte. *Annalen d. Chemie und Pharm.*, t. 127, p. 243 (1863).

mélangée de carbonate de zinc. Dans 53 gr. de seigle, ainsi cultivé, dans 65 gr. de sarrasin, dans 115 gr. de pois, il ne retrouve pas de zinc et conclut que les plantes n'absorbent pas du tout ce métal ou très peu. Etudiant le pouvoir d'absorption du sol pour les solutions salines, il constate, à propos du sulfate de zinc, que ce sel est retenu par la terre.

Une expérience fortuite fut faite en 1866 par REICHARDT (1). « Par mégarde, raconte-t-il, une livre d'une solution sirupeuse de chlorure de zinc fut versée, partie sur un gros pied de laurier rose, partie sur un pied d'*Agapanthus*. Les parties de l'*Agapanthus* directement atteintes moururent, les autres non ; le *Nerium oleander* perdit une quantité de feuilles, mais en même temps parurent de jeunes pousses d'un vert clair ». Deux à trois jours après l'empoisonnement, REICHARDT analysa les feuilles tombées qui renfermaient 0,1436 % d'oxyde de zinc et un rameau vert avec feuilles qui en renfermait 0,664 %. Des essais ultérieurs ont donné les résultats suivants qu'il me paraît intéressant de reproduire :

	8 jours après	6 semaines après	au printemps suivant
Ecorce	1,066	0,271	0,330
Bois	0,500	0,283	0,385
Branches	»	»	0,346
Feuilles	»	0,214	0,406

Plus méthodique est le travail de FREITAG (2), paru en 1870. Sa technique n'est pourtant pas irréprochable : c'est ainsi qu'il plonge les racines des plantes expérimentées (maïs et pois) dans des solutions nutritives et dans des solutions plus ou moins concentrées de sulfate de zinc, alternativement et pendant des temps inégaux. Quoiqu'il en soit, je retiens des conclusions qu'il a énoncées, ce

(1) REICHARDT. Ueber die Wirkung von Chlorzink auf einige Pflanzen. *Annalen d. Landwirthschaft*, t. 50, p. 235 (1867).

(2) FREITAG. Ueber den Einfluss des Zinks auf die Vegetation. *Vierteljahresschrift für praktische Pharmacie*, t. 19, p. 427 (1870).

qu'il y a d'essentiel. Toutes les plantes qui croissent sur un milieu additionné de zinc, accaparent ce corps par leurs racines. Pour qu'elles n'en souffrent pas, il faut que ces solutions soient très diluées.— La terre retient les sels de zinc de solutions étendues, la limite d'absorption pour une terre de champ étant comprise entre 0,021 et 0,024 % en oxyde de zinc. La quantité d'oxyde de zinc que les plantes absorbent ne croît pas proportionnellement à la quantité de zinc contenue dans le sol ; elle varie entre d'étroites limites. La majeure partie du zinc se rencontre dans les feuilles et les branches, la plus petite dans les semences. La proportion de zinc dans les cendres des différentes parties de la plante varie peu. La plante ne possède pas la faculté de choisir entre les substances qui sont à sa disposition, et elle accapare le zinc comme les autres. Le zinc n'a aucune influence digne de remarque sur la germination et la croissance et n'entrave pas davantage la formation des graines. Des graines provenant de telles plantes germent tout à fait normalement, et peuvent être impunément consommées par l'homme et les animaux, tant sont petites les quantités de zinc qu'elles renferment. La présence de zinc dans un sol et, par suite, dans les plantes qui y croissent, est tout à fait sans inconvénient.

Tel n'est pas l'avis de KÖNIG (1), qui, dans un travail paru en 1881, donne l'addition de sulfate de zinc à un sol, comme nocive pour les plantes qui y croissent.

La méthode des cultures aqueuses est appliquée en 1881 par KRAUCH (2). C'est ainsi qu'il élève des plants d'orge dans des solutions nutritives de concentration variable et additionnées de doses diverses de zinc. Je relève l'emploi de doses de sulfate de zinc, correspondant à 25, 50, 100, 200 milligr. de zinc pour 1.000. Résultat : tous les plants

(1) KÖNIG. *Berichte der Versuchs-Stationen.*, Münster (1881), p. 45.

(2) KRAUCH. — Ueber Pflanzenvergiftungen. (*Journal für Landwirthschaft*, t. 30, p. 271. 1882).

sont morts en 5 semaines. Des essais faits dans des conditions analogues avec du ray-grass, d'autres faits avec des boutures de saule, ont fourni d'aussi brillants résultats. Aussi l'auteur conclut-il que, « de l'eau renfermant du sulfate de zinc est inutilisable pour l'irrigation des prairies.

Des expériences de STORP (1) (1883) je ne rappelle que les suivantes. Il fait filtrer des solutions diversement concentrées de zinc sur des sols de composition chimique diverse ; ceux-ci retiennent le zinc en grande proportion (80 % et plus). Il arrose des chênes (très jeunes, en pots) avec des solutions de sulfate de zinc à 0 gr. 1, 0,2, 0,4 pour 1.000. Après un an et demi de ce traitement, ils ne présentent apparemment aucune différence. Des pins, soumis au même régime, donnent des pousses étonnamment courtes et les aiguilles prennent une teinte jaune pâle, Des herbes qui avaient poussé sur la terre des pots à expériences renfermaient du zinc. De l'orge, du ray-grass, des boutures de saule, moururent en peu de jours dans des vases de culture renfermant du sulfate de zinc. A l'obscurité, ce sel de zinc ne serait pas toxique, tandis qu'il se comporte comme un violent poison à la lumière. Enfin le zinc n'agit pas seulement par lui-même, mais en ce sens qu'il appauvrit le sol en potassium, sodium, calcium et phosphore.

Aucun document intéressant directement notre question n'est à retirer de la brochure de VON SCHRÖDER et REUSS (2), si ce n'est le rappel, avec critique judicieuse, des expériences de FREITAG.

F. NOBBE, P. BÖSLER et H. WILL (3) étudient (1884) la

(1) STORP. — Ueber den Einfluss von Kochsalz und zinksulfathaltigem Wasser auf Boden und Pflanzen *Landwirthschaftliche Jahreshücher*, p. 795 (1883).

(2) V. SCHRÖDER und REUSS. — *Die Beschädigung der Vegetation durch Rauch und die Oberharzer Rauchhüttenschäden*. Berlin, 1883.

(3) F. NOBBE, P. BÖSLER et H. WILL. — Untersuchung über die Giftwirkung des Arsen, Blei und Zink im pflanzlichem Organismus *Die Landwirthschaftlichen Versuchs-Stationen*, XXX, 381 (1884).

toxicité de l'arsenic, du plomb et du zinc. Ils considèrent le zinc comme plus nuisible que le plomb pour les plantes; l'action toxique se manifeste par la diminution du poids des récoltes (les expériences sont faites sur des pois), la moindre largeur et le flétrissement des feuilles. Le zinc pénètre dans la plante et les auteurs publient un certain nombre de dosages.

De 1885 date l'important travail de BAUMANN (1). Il fait une première série d'essais de culture en milieu liquide. Ses solutions nutritives renferment du nitrate de calcium, du nitrate de potassium, du phosphate bi-potassique, du sulfate de magnésie, du phosphate de fer et il les additionne de doses variables de zinc depuis 1/10 de milligr. jusqu'à 10 milligr. Il se préoccupe de ne comparer que des plants vraiment bien comparables, des plants dont le développement initial ait été complètement identique, et il s'efforce de les mettre dans des conditions tout à fait égales. Ses essais, par l'ensemble des précautions prises, paraissent mériter toute créance. Il les fait porter sur les espèces suivantes : *Polygonum Fagopyrum*, *Raphanus sativus*, *Onobrychis sativa*, *Anthyllis vulneraria*, *Spergula arvensis*, *Brassica oleracea*, *Beta vulgaris*, *Trifolium pratense*, *Pinus sylvestris*, *Abies excelsa*, *Vicia sativa*, *Hordeum vulgare*.

Ils peuvent être ainsi résumés :

1° Le zinc exerce sur les plantes une influence plus nuisible qu'on ne le pensait antérieurement, puisqu'avec 10 milligr. elles meurent. Une seule exception à signaler, et elle est intéressante : les Conifères résistent étonnamment à l'action du zinc. Le rapprochement s'impose entre ce fait et celui que j'ai observé moi-même, la richesse en zinc des cendres de Conifères. 2° Des traces de sel de zinc sont

(1) A. BAUMANN. — Das Verhalten von Zinksalzen gegen Pflanzen und im Boden (*Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen*, XXXI, 1, 1885).

inoffensives ; toutes les plantes végètent en présence d'un milligr. de zinc pour 1.000, sauf le *Raphanus*. 3° L'influence nocive du zinc commence à se manifester entre 1 et 5 milligr. pour 1.000. 4° La résistance à l'action toxique du zinc varie avec les espèces ; les plantes âgées sont plus sensibles que les plantes jeunes. 5° Un des premiers symptômes de l'intoxication est le virage du vert des feuilles au jaune.

BAUMANN fait une deuxième série d'essais : il cultive des plantes fourragères sur des sols variés qu'il arrose avec des solutions de sulfate de zinc ou qu'il additionne de carbonate de zinc. Il observe entre autres faits qu'une même dose de sulfate de zinc est plus ou moins nuisible suivant la nature du sol ; c'est que le zinc est retenu très inégalement suivant le terrain : très bien par l'humus, moins bien par l'argile ou le calcaire, mal par le sable. Il établit que le carbonate de zinc ne cause pas grand dommage grâce à son insolubilité. Il se dissout, il est vrai, dans l'acide carbonique, mais cette solubilité est restreinte en présence de carbonate de calcium.

LABAND (1) a publié en 1901 une intéressante bien qu'incomplète revue des travaux faits sur la distribution du zinc chez les plantes ; mais il n'a apporté comme contribution personnelle à la question que les dosages de zinc dans les plantes silésiennes cités dans la première partie de cette thèse.

HASELHOFF (2), dans un travail récent (1903-1904), constate que l'oxyde de zinc à la dose de 0,2 % a un effet légèrement nuisible sur la production du blé ; en présence de

(1) LABAND. — Zur Verbreitung des Zinkes im Pflanzenreich (*Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genuss-Mittel*, IV, p. 489, 1901).

(2) E. HASELHOFF. — Versuche über die Einwirkung schwelliger Säure, Zinkoxyd und Zinksulfat auf Boden und Pflanzen. *Bericht. Versuchstat. Marburg* (1903-1904). Autoreferat im *Jahresbericht über die Fortschritte auf dem Gesamtgebiete der Agrikultur-chemie*. Dritte Folge, VII, 261 (1904).

chaux, il donnerait une plus grande réduction de la récolte ; quant au sulfate de zinc, il se comporte à la même dose comme un toxique violent.

Si l'on procède à un criblage un peu rigoureux des faits accumulés dans les travaux dont j'ai donné un résumé, on voit qu'ils se réduisent à ceci :

1° Le zinc, surtout sous ses formes solubles, se comporte comme un poison des plantes, celles-ci ayant d'ailleurs une force plus ou moins grande de résistance à cette intoxication. 2° Les plantes absorbent le zinc des milieux où on les fait vivre, ce fait expérimental venant corroborer ce que l'on savait déjà des plantes vivant dans un sol naturellement zincifère.

Quel est alors le degré de généralité des faits que j'ai établis dans les deux chapitres précédents ? Le *Sterigmatocystis*, la levure sont-ils des organismes aberrants à ce point de vue particulier ? Le zinc constituerait-il pour eux, et pour eux seuls, un élément utile, ou, du moins, serait-il ici utile, ici nuisible, sans que nous puissions dire ni pourquoi, ni comment ? Je ne le pense pas. Les phénomènes biologiques nous frappent dès l'abord par leur diversité ; les organismes nous apparaissent comme merveilleusement spécialisés en vue d'actions chimiques précises, mais plus nous étudions ces phénomènes et ces organismes, plus nous voyons se substituer à l'apparente diversité du début la merveilleuse unité des phénomènes de la vie.

Je ne pense donc pas que l'action biologique du zinc, si remarquablement nette avec l'*Aspergillus* et la levure soit un phénomène exceptionnel ; loin de s'appliquer à un nombre restreint d'espèces, elle doit avoir un caractère de beaucoup plus grande généralité ; la difficulté est de pouvoir le mettre en évidence par la méthode expérimentale. Je dois dire tout de suite qu'en cherchant si cette action s'applique aux plantes Phanérogames, je me suis

précisément heurté à de grosses difficultés expérimentales et ce sont ces difficultés dont il me faut d'abord parler.

§ 2. Les conditions expérimentales.

La première difficulté résulte de ce que toute graine apporte avec elle un ensemble de réserves, non seulement des réserves azotées, grasses ou hydrocarbonées dont on parle beaucoup, mais encore des réserves minérales, dont, sauf l'acide phosphorique et la potasse, on ne parle guère. Si le zinc est un élément constant des graines, il est clair qu'on introduit au début de l'expérience une inévitable cause d'erreurs. Si petite que soit la quantité de zinc introduite par cette voie, si cette quantité suffit à assurer la marche régulière du phénomène dans lequel intervient cet élément catalytique, il est évident que l'expérimentateur ne verra rien de ce qu'il cherche. Il se passera ici ce qui se passe avec l'*Aspergillus* quand on le fait vivre sur un mélange de sels mal purifiés : Le début de la courbe échappera à l'observation ; on ne verra de celle-ci qu'un plateau plus ou moins étendu suivi d'une chute plus ou moins rapide. Si pourtant, on a cette bonne fortune que la réserve en zinc de la graine ne représente pas la quantité optima ou une quantité très voisine de celle-ci on pourra observer au moins un fragment de la courbe d'accroissement due à l'introduction de ce métal dans les milieux de culture, mais les différences dans les rendements seront assez faibles, et l'opérateur se trouvera à la merci des moindres incidents expérimentaux.

En dehors même de cette circonstance, l'action biologique du zinc sur les plantes vertes, peut n'être pas du même ordre de grandeur que pour les plantes sans chlorophylle, et tandis que, chez celles-ci, l'introduction du zinc, multipliait les rendements par 2 ou 3, il peut, chez celles-là, ne les multiplier que par un facteur beaucoup

plus petit. Pour affirmer alors la réalité de cette action, il faudra se sentir bien à l'abri de toute cause d'erreur. Et les causes d'erreurs, autres que celle que j'ai dès le début signalée, sont nombreuses. Il faut en effet faire porter les comparaisons sur des plantes ne différant entre elles que par le facteur de variation volontairement introduit. Or, en est-on toujours rigoureusement sûr?

Ces considérations générales me rendent plus facile l'aveu que deux années d'expérimentation ne m'ont pas fourni l'ensemble de documents que j'espérais.

Mes premiers essais ont été faits à Tours dans des conditions expérimentales dont je n'ai pas tardé à reconnaître l'insuffisante rigueur. La méthode que j'employais était la méthode classique des cultures en solutions nutritives. Je l'appliquais de la façon suivante : On fait germer des graines dans du sable ou de la sciure de bois ; quand les jeunes plantes ont étalé leurs deux premières feuilles, on choisit un lot de ces plantes aussi semblables que possible par la taille, le développement de leurs racines et on les transporte dans des séries de flacons renfermant une solution nutritive, celle de DETMER, par exemple. Un certain nombre de ces solutions ont été additionnées de proportions variables de zinc sous forme de sulfate, depuis un centième de milligr. jusqu'à 10 milligr. La jeune tige entourée d'un tampon d'ouate et maintenue par lui passe à travers un trou fait au milieu du bouchon de liège du flacon. Les flacons ont été recouverts de papier noir pour éviter que la lumière n'y pénètre. On rétablit le niveau de la liqueur avec de l'eau distillée à mesure qu'il baisse, et de temps à autre on renouvelle entièrement la dite solution.

Les essais ont porté sur *Polygonum fagopyrum*, *Zea Maïs*, *Raphanus sativus*, *Phaseolus vulgaris*. Les plantes étaient conservées en serres. On note la rapidité d'apparition des feuilles, la longueur des tiges, etc.

Je dois dire tout de suite qu'il n'y a rien de certain à

déduire de ces observations, je veux dire qu'il n'y a pas à en déduire autre chose que ce que déduisit BAUMANN d'expériences analogues, celles que j'ai précédemment relatées, et dont, à ce moment là, je ne connaissais pas le détail. Or, le but de cet expérimentateur et le mien sont tout-à-fait différents. BAUMANN voulait surtout savoir où commençait la dose toxique ; les doses inférieures à celle-ci, il les considère purement et simplement comme « inoffensives », et ne s'y arrête pas ; pour moi, c'est tout à fait l'inverse. c'est cette zone dite inoffensive qui m'intéresse et où je cherche à découvrir une phase d'accélération des phénomènes nutritifs sous l'influence de doses très petites de zinc. Peut-être la détermination des poids secs eût-elle donné quelques résultats, mais cette détermination n'a pas été faite.

J'ai donc repris la question et cherché à perfectionner la méthode. Les modifications ont consisté en l'emploi d'un dispositif expérimental destiné à assurer la stérilité des milieux de culture, en l'emploi de milieux nutritifs plus complets, et la détermination des variations de poids de la matière sèche.

Le premier souci fut d'opérer en milieu aseptique. Bien des auteurs ont essayé de faire de pareilles cultures et y sont parvenus. Voici la technique que j'ai personnellement suivie :

Stérilisation des graines. — Je stérilise les graines par une première immersion de cinq minutes dans une solution alcoolique de sublimé corrosif à 1 ‰, une deuxième immersion de même durée dans une solution aqueuse du même corps à la même concentration, puis lavage rapide à l'acide chlorhydrique au centième, puis série de lavages, au moins trois, à l'eau stérilisée. L'opération est rapide, elle est peut-être un peu brutale puisque avec le blé dont le caryopse a des téguments peu perméables, il

y a un déchet d'environ 35 % de graines non germées ou germées tardivement. La stérilisation est par contre assurée et les cas d'infection sont rares.

Peut-être la meilleure des méthodes consisterait-elle à choisir comme sujets d'expériences des plantes dont on aurait prélevé aseptiquement des graines dans le fruit avant la déhiscence ; cette méthode a été préconisée par MM. MATRUCHOT et MOLLIARD. Je n'ai pas eu l'occasion de l'appliquer.

Germination. — Beaucoup d'auteurs font germer les graines dans des tubes renfermant une petite quantité d'eau stérile, les graines étant maintenues à la surface de celle-ci par un tampon d'ouate. Lorsque la plantule a acquis une longueur convenable, on la transporte dans un milieu nutritif. D'autres projettent la graine dans une petite nacelle de soie maintenue à la surface de la solution nutritive et la plante se développe sous une cloche de verre à parois stérilisées. Il m'a semblé qu'il y aurait avantage à adopter un autre dispositif et j'ai, avec mon collègue M. H. AGULHON, qui poursuit des recherches dans un ordre d'idées analogue, imaginé le dispositif suivant (Planche II).

Nous utilisons des flacons dont la capacité peut varier avec la plante expérimentée, mais qu'il suffit de prendre de 500 cc. pour le blé qui m'a uniquement servi dans ces expériences. Ces flacons sont à fond plat en verre mince et stérilisables à l'autoclave. Leur col large est bouché d'un bouchon plat de liège, soigneusement calibré, perforé au milieu d'un trou de 1 cent. 4 de diamètre. Ce trou est traversé par un tube de verre de 7 à 8 cent. de long, à l'extrémité inférieure duquel on a fixé par un dispositif facile à concevoir un diaphragme de gaze hydrophile. Le bouchon de liège est perforé d'un autre orifice qui livre passage à un petit tube de verre formant siphon. L'extré-

mité libre de ce siphon est munie d'un tube court de caoutchouc qu'obstrue un fragment de tige de verre pleine. Les choses ainsi disposées, on introduit dans les flacons 500 cc. du liquide nutritif choisi.

La formule adoptée dans ces expériences est plus complexe que celle de DETMER ou de KNOP. La voici :

Nitrate de calcium cristallisé.....	0,509
Nitrate d'ammonium.....	0,500
Phosphate acide de potassium... ..	0,697
Sulfate de magnésium	0,506
Alun de potasse	0,100
Sulfate de fer ammoniacal	0,0175
Sulfate de manganèse.....	0,004
Chlorure de sodium.....	0,005
Iodure de potassium	0,001
Silicate de potasse.....	0,190
Eau distillée, Q. S. pour 1000 cc.	

Les poids des différents corps ont été calculés de façon à ce qu'il y ait un rapport déterminé entre les quantités des éléments ; ainsi les chiffres ci-dessus correspondent à 0 gr. 001 de fer, 0 gr. 001 de manganèse, 0 gr. 005 d'aluminium, 0 gr. 05 de magnésium, 0 gr. 100 de calcium, 0 gr. 200 de potassium, 0 gr. 020 de sodium, etc. Bien entendu tous les sels sont purs et l'eau a été redistillée dans un appareil en verre. Dans les flacons qui doivent renfermer le zinc, la quantité convenable du sulfate de ce métal a été ajoutée ; le bouchon des flacons est solidement maintenu au moyen d'un fil de cuivre noué au-dessous de la bague du col. On surmonte le tube large d'un autre tube d'un diamètre un peu plus grand, long de 15 cent. environ, maintenu autour du premier par de l'ouate et fermé à son extrémité libre par un tampon de coton. Tout le système est stérilisé à l'autoclave par chauffage à 115° pendant 30 minutes. Les flacons refroidis, on paraffine leur bouchon et tout est prêt pour le semis. On y procède ainsi : Les graines stérilisées comme je l'ai dit et bien

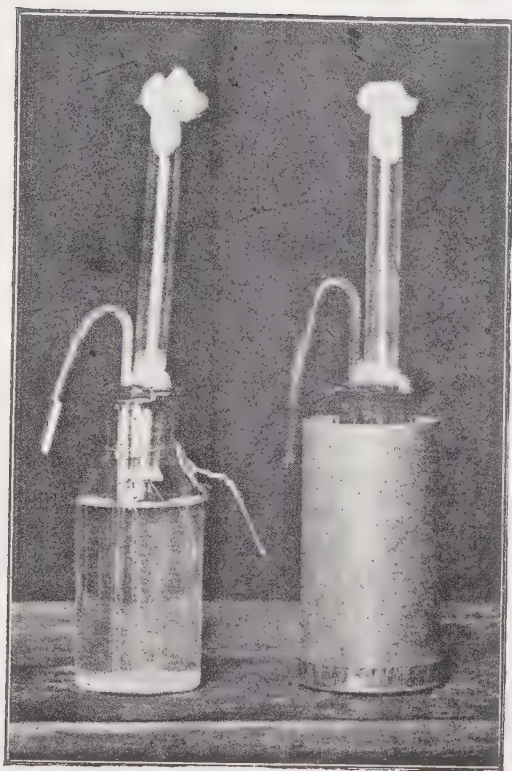


PLANCHE II.

lavées sont prises une à une avec une pince flambée et chacune d'elles est projetée à travers le tube qui surmonte un flacon sur le petit tamis de gaze. Un aide enlève rapidement les bouchons d'ouate et les remet aussitôt la graine tombée. Les chances d'infection pendant la manipulation sont donc réduites au minimum. Les flacons ensemencés sont mis au thermostat à 22° environ.

Il est prudent de préparer un nombre important de flacons, double par exemple de celui que l'on désire observer, car il faut tenir compte de l'inévitable déchet. J'ai dit, en effet, qu'un tiers environ des graines ne germait pas ou germait avec un trop notable retard pour entrer en ligne de compte ; il faut prévoir aussi les cas d'infection qui diminuent encore le chiffre de quelques unités. Comme il importe aussi de faire porter les observations non sur une seule série, mais sur plusieurs, de façon à établir des moyennes, on voit que la préparation de pareils essais est assez laborieuse.

Les graines germées, on porte les flacons à la lumière, soit en serre, soit dans une salle quelconque devant une fenêtre. On évite l'action de la lumière sur les racines en introduisant chaque flacon dans une boîte cylindrique en carton ; ce dispositif permet de s'assurer à tout instant de la limpidité du milieu de culture.

Quand la première feuille, s'il s'agit de blé, atteint le tampon d'ouate qui ferme le tube supérieur, on enlève ce tube, et on fixe la tige contre la paroi du tube intérieur au moyen de ouate stérile. S'il y a lieu, une branche d'osier est fixée au col du flacon et aidera au soutien de la plante. Dès que possible, les flacons sont placés dehors.

On peut faire durer l'expérience un temps plus ou moins long. Avec les blés, j'ai arrêté les essais au bout de 6 semaines (Planche III) ou de 2 mois ; mais on peut les prolonger davantage, la plante peut très bien fleurir et donner un bel épi dans ces conditions. Bien entendu, l'évaporation et la

transpiration étant très actives, il faut, de temps en temps, remplacer l'eau évaporée par de l'eau distillée stérile ; on y arrive facilement au moyen du siphon.

Au bout du temps qu'on s'est fixé, l'expérience est arrêtée ; on enlève les plantes, on lave rapidement à l'eau distillée les racines préalablement séparées du reste de la plante, on les sèche entre des doubles de papier à filtrer, et l'on pèse séparément, organes aériens et racines. On fait sécher le tout à l'étuve à 100°, jusqu'à poids constant, et l'on prend les poids secs des mêmes organes.

§ 3. Résultats expérimentaux

Ainsi débarrassé des détails techniques, je puis maintenant exposer les résultats auxquels je suis arrivé en expérimentant sur le blé durant l'été de 1907. Ces essais ont été faits les uns en mai-juin, les autres en juillet-octobre. Mieux renseigné sur les conditions expérimentales par mes premières tentatives, j'ai obtenu, dans mes expériences de juillet-septembre, les résultats les plus faciles à interpréter. Je dirai donc d'abord quels ils sont.

Expérience de juillet-septembre :

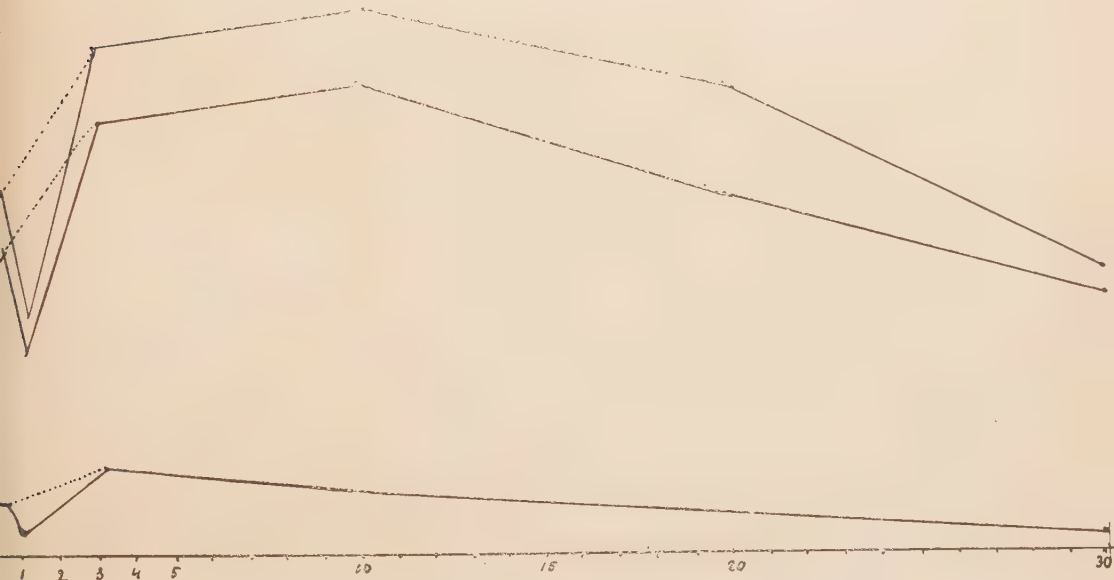
Elle a été préparée comme il est exposé ci-dessus. Une série de flacons n'a pas reçu de zinc. Les séries suivantes ont reçu respectivement 0 gr. 0001, 0 gr. 0005, 0,001, 0,003, 0,005, 0,010, 0,020, 0,030 de zinc ; les dilutions du zinc s'étagent ainsi de 1/5.000.000 à 1/16.000.

L'ensemencement a été fait le 12 juillet. Les flacons ont été maintenus au grand air jusqu'au 12 septembre. Les plants de blé prospéraient et l'expérience aurait été poursuivie plus longtemps si l'apparition sur les feuilles de l'*Erysiphe graminis* ne m'avait fait craindre la perte de l'expérience. Voici les poids secs des blés de chacune des

séries ; ces poids sont des moyennes, calculées d'après les chiffres fournis par trois ou deux individus ; la quatrième s'est trouvée réduite à un seul.

Zinc introduit	Poids secs (P) des organes aériens	Poids secs (p) des racines	Poids totaux	Rapport p/P
0 millig.	0,772	0,145	0,917	0,18
0,1	0,788	0,148	0,936	0,18
0,5	0,830	0,140	0,970	0,16
1	0,560	0,085	0,665	0,15
3	1,150	0,232	1,382	0,20
5	1,185	0,210	1,395	0,17
10	1,270	0,180	1,450	0,14
20	0,912	0,127	1,289	0,13
30	0,720	0,045	0,765	0,06

Un graphique traduira clairement les faits. Construisons-le :



Ces lignes représentent les variations de poids, en présence de doses croissantes de zinc, des racines (ligne infé-

rieure), des organes aériens (ligne moyenne), de la plante totale (ligne supérieure)

Elles montrent d'abord l'augmentation de poids d'une part des racines, de l'autre de la tige et des feuilles avec pourtant un accroc pour la dose de 1 milligr., mais j'ai dit que les circonstances ont réduit cette série à un seul individu, et il a été si manifestement faible dès le début qu'il paraît légitime de l'éliminer. Puis l'on voit le poids des organes aériens croître encore légèrement jusqu'à la dose de 10 milligr. tandis que les racines sont déjà touchées et décroissent. Au delà de 10 milligr., chute des poids totaux. Il me semble que la courbe rappelle assez celle fournie par l'*Aspergillus*, pour que le rapprochement n'ait rien de forcé, seulement ici l'action favorisante se traduit avec des doses plus élevées. Il me semble donc légitime de dire que dans les conditions expérimentales où je me suis placé, le zinc exerce déjà, à une dilution de 1/5.000.000, et jusqu'à une dose qui ne doit pas dépasser 1/50.000 une action favorable sur le développement du blé. On remarquera que le début de la dose toxique est dans cette expérience de 10 milligr. pour 500, soit 0,020 pour 1.000. Or, BAUMANN dans ses essais, dont aucun, il est vrai, n'a porté sur le blé, donne la dose de 10 milligr. pour 1.000 comme mortelle, et il fixe le début de la toxicité de 1 à 5 milligr. J'attribue cette différence moins à l'espèce particulière que j'ai étudiée qu'aux conditions dans lesquelles je me suis placé, parmi lesquelles deux sont fondamentales : l'emploi d'un liquide nutritif plus complexe, et l'exposition des essais en plein air. Cette dernière circonstance me paraît particulièrement à souligner, et ceci n'amène à relater mes expériences de Mai-Juin.

Expériences de mai-juin :

Celles-ci ont été faites dans les conditions générales que l'on connaît, à cette différence près que les essais sont

restés renfermés dans une serre à la température moyenne de 22°. Ils ont duré six semaines du 1^{er} mai au 13 juin et ont donné les résultats suivants :

ZINC introduit	Poids secs (P) des organes aériens	Poids secs (p) des racines	Poids totaux	Rapport p/P
0 millig.	0,313	0,076	0,389	0,24
0,05	0,255	0,045	0,300	0,17
0,25	0,320	0,055	0,375	0,17
0,50	0,255	0,059	0,314	0,23
1 »	0,218	0,040	0,258	0,18
2,50	0,236	0,033	0,269	0,14
2,75	0,263	0,058	0,321	0,22
5 »	0,187	0,036	0,223	0,19

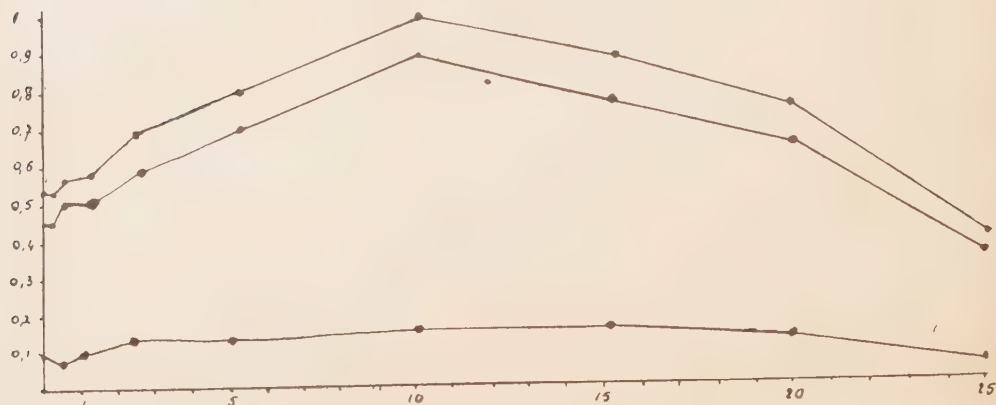
La seule impression que l'on puisse retirer de l'inspection de ce tableau, c'est que les chiffres sont assez discordants et que le zinc a eu ici, aux doses utilisées, une influence plutôt nocive.

Voici maintenant une expérience dans laquelle les plantes sont restées en serres dix jours seulement, puis portées en plein air. Cette expérience a duré six semaines, du 16 mai au 27 juin.

ZINC introduit	Poids secs (P) des organes aériens	Poids secs (p) des racines	Poids totaux	Rapport P/p
0 millig.	0,442	0,093	0,535	0,21
0,05	0,449	0,084	0,533	0,18
0,25	0,445	0,073	0,518	0,16
0,50	0,477	0,070	0,547	0,14
1,25	0,482	0,083	0,565	0,17
2,50	0,565	0,110	0,675	0,19
5 »	0,658	0,112	0,770	0,17
10 »	0,860	0,120	0,980	0,14
15 »	0,735	0,135	0,870	0,18
20 »	0,615	0,101	0,716	0,16
25 »	0,300	0,070	0,370	0,23

L'expérience se traduit graphiquement comme je le figure ci-après, et l'on voit que ses résultats fortifient dans les

grandes lignes ceux que j'ai énoncés à propos de l'expérience de juillet-septembre.



Après avoir dit mes efforts pour perfectionner la technique expérimentale et préciser les conditions d'une expérience bien faite, je dois dire combien ces essais satisfont peu l'esprit et combien les résultats paraissent contingents à côté de ceux que l'on obtient avec des moisissures et des levures. Ce n'est pas que les augmentations en poids ne soient pas notables puisque, par addition de zinc, j'ai pu augmenter les rendements d'environ 50 %. Mais dans une série sans zinc ou dans une série de plantes avec de mêmes quantités de zinc, les variations avec les individus sont notables, atteignant dans quelques cas jusqu'à 30 %. Je sais bien que l'opérateur peut et, à mon sens, doit éliminer les individus manifestement anormaux. Je sais bien aussi qu'il courra d'autant moins de chances de se tromper, qu'il établira ses moyennes sur un plus grand nombre d'individus, et cette observation m'amène justement à dire qu'il serait peut-être utile, lorsqu'il s'agit d'éléments catalytiques, tel que celui que j'ai étudié, de ne pas s'arrêter trop longuement à la recherche de perfectionnements techniques. Pourquoi ne pas essayer directement l'action des éléments en question dans les conditions mêmes de la

grande culture, sur des hectares de terre, dans des conditions telles que les variations individuelles disparaissent. C'est ce qui a été fait pour le manganèse et l'on sait quels résultats ces essais ont fournis. J'ai commencé des essais dans cet ordre d'idées. Nous avons, M. BERTRAND et moi, établi la formule d'un engrais complexe où entrent le manganèse et le zinc comme éléments catalytiques. Appliqué l'année dernière, cet engrais a donné des rendements supérieurs à ce que donne l'engrais seulement manganésé. Mais l'amélioration qui est résultée de l'addition du zinc est incomparablement plus faible que celle qui résulte de l'addition du manganèse. Je ne me crois d'ailleurs pas en droit de publier des résultats, il faudra évidemment des années d'expérimentation pour débrouiller cette question si intéressante des engrais complémentaires et fixer les conditions de leur emploi. La question est particulièrement délicate pour des éléments comme le zinc dont on ne saurait impunément introduire des quantités notables dans une terre.

§ 4. — Fixation du zinc par le blé.

Bien que les essais faits de divers côtés et les miens aient donné la preuve de la fixation du zinc par les plantes vertes, j'ai complété cette partie de mon travail en analysant les cendres de quelques-uns des blés expérimentés. Voici les résultats obtenus :

1° — Plant ayant vécu en présence de 3 milligr. de zinc :

		gr.		gr.
Il pesait sec	Racines.....	0,28	{	1,62
	Tige et feuilles.....	1,34		
Il renfermait	Racines.....	0,00020	{	0,00102 Zn
	Tige et feuilles.....	0,00082		

2° — Plant ayant vécu en présence de 5 milligr. de zinc :

		gr.	gr.
Il pesait sec {	Racines.....	0,21	{ 1,39
	Tige et feuilles.....	1,18	
Il renfermait {	Racines.....	0,00025	{ 0,00106 Zn
	Tige et feuilles.....	0,00081	

3° — Plant ayant vécu en présence de 20 milligr. de zinc ;

Il pesait sec {	Racines.....	0,145	{ 1,225
	Tige et feuilles.....	1,08	
Il renfermait {	Racines.....	0,00081	{ 0,00194 Zn
	Tige et feuilles.....	0,00113	

4° — Plant ayant vécu en présence de 30 milligr. de zinc :

Il pesait sec {	Racines.....	0,045	{ 0,765
	Tiges et feuilles.....	0,72	
Il renfermait {	Racines.....	0,00069	{ 0,00211 Zn
	Tige et feuilles.....	0,00142	

On voit ainsi que le premier plant avait fixé 34 % du zinc qu'on lui avait offert, le second 20 %, le troisième 9,5 %, le quatrième 7 %. Ces chiffres nous montrent que ces plants renfermaient après deux mois de culture, le premier : $\frac{6,3}{10.000}$ de zinc, le second : $\frac{7,6}{10.000}$, le troisième : $\frac{15}{10.000}$, le quatrième : $\frac{27}{10.000}$.

Leurs organes aériens renfermaient respectivement 6/10.000, 7/10.000, 10/10.000, 19/10.000 de zinc.

Leurs racines renfermaient respectivement 7/10.000, 12/10.000, 55/10.000. 150/10.000 de zinc.

Ces chiffres sont intéressants parce qu'il nous fournissent une notion sur la dose toxique du zinc pour le blé expérimenté. Il ne peut fixer sans dommage une dose de zinc dépassant de beaucoup 7/10.000 de son poids.

On peut se demander aussi si le zinc que cette plante absorbe entraîne des modifications d'ordre anatomique particulièrement curieuses. Je n'ai pas approfondi ce sujet;

je ne l'ai examiné que pour les doses faibles de zinc, les seules au reste dont je me sois préoccupé au cours de ce travail. La racine dont le diamètre diminue pour les plus faibles doses de zinc diffère de la racine normale par la réduction progressive de son appareil vasculaire, et la feuille ne m'a pas présenté de modification anatomique digne de remarque.

CONCLUSIONS.

Depuis plus d'un siècle que les physiologistes se préoccupent des questions relatives à l'alimentation des êtres vivants, il semble que les connaissances fondamentales soient acquises; le problème présente pourtant encore bien des inconnues. En s'en tenant aux végétaux et à leur alimentation minérale, on a d'abord vu en gros qu'un certain nombre d'éléments, qui sont abondamment présents dans la plante, constituent pour elle des éléments essentiels. DE SAUSSURE trouve du phosphate de chaux dans les cendres de toutes les plantes vertes et il en conclut que les plantes ne sauraient vivre sans lui.

La méthode dite de synthèse apprend avec plus de certitude que la méthode analytique le degré d'utilité de ce phosphore et de cette chaux. G. VILLE, BOUSSINGAULT et nombre d'autres savants étudient la part qui revient aux divers éléments minéraux, potasse, magnésie, sulfates, chlorures, etc.

Etudes analytiques et synthétiques sont jusqu'alors assez faciles.

L'étude de l'assimilation de l'azote sous toutes ses formes, depuis celle d'azote libre jusqu'à celle de nitrates, de sels ammoniacaux et de combinaisons organiques constitue déjà un problème autrement délicat. Elle met en évidence des phénomènes inattendus, telle cette curieuse symbiose de micro-organismes et de plantes vertes pour la fixation de l'azote atmosphérique.

Mais l'analyse découvre dans les plantes des éléments moins abondants que les premiers, du manganèse, du fer,

del'aluminium, etc., et volontiers on les considérerait comme accidentels et sans rôle physiologique quand leur présence apparaît non plus exceptionnelle mais générale, quand pour tel d'entre eux la fonction se révèle non plus négative mais fondamentale.

Et ce n'est pas tout. A côté des éléments plastiques et des éléments catalytiques, on fait, à tort peut-être, une place à part pour des éléments à rôle « *antitoxique* ». Ceux-ci ont pour effet de contrebalancer l'action toxique d'un autre élément ; ainsi, d'après M. OSTERHOUT, dans une solution de chlorure de magnésium, de certaine concentration, des grains de blé sont incapables de se développer ; ajoute-t-on à cette solution du chlorure de strontium, la croissance se fait très bien. Le strontium n'a pas par lui-même de valeur nutritive, il ne fait que contrebalancer l'influence toxique du magnésium. Ce rôle anti-toxique, des éléments — ou très toxiques par eux-mêmes, comme le baryum, ou au contraire nutritifs comme le calcium — peuvent le jouer.

Ce calcium est d'ailleurs un bien singulier élément ; on ne saurait le classer dans aucun des trois groupes ci-dessus, car en vérité il appartient à tous les trois. Il semble bien, malgré tout ce qui a été écrit sur cette question controversée, qu'il soit non seulement utile, mais indispensable aux plantes vertes, où sa présence en proportion notable est constante ; à ce titre, c'est un élément plastique. Il intervient en très petite quantité dans des phénomènes diastasiques, et à ce titre il constitue un élément catalytique. Inutile pour la croissance des plantes sans chlorophylle, comme on le sait depuis PASTEUR et RAULIN, il se montre toutefois utile quand, d'après M. OSTERHOUT, on fait pousser ces plantes dans un milieu très concentré et toxique pour elles. Il se conduit alors en élément antitoxique.

Il semble que nous soyons loin de la question du zinc, nous sommes au contraire tout près d'elle. Les questions

ne gagnent pas à être isolées, elles s'éclairent à la lumière de mieux élucidées, comme elles projettent une lueur sur de plus obscures.

Le zinc était considéré jusqu'ici comme un élément rare des cendres végétales. On citait surtout comme renfermant ce corps les plantes dites calaminaires, et les plantes croissant sur des sols de richesse exceptionnelle en zinc. Pourtant, on savait déjà que le zinc, en dehors de ses vastes gisements, n'est pas rare dans la nature : on l'a trouvé à l'état de trace dans un grand nombre de roches, il existe dans l'eau de la mer, dans quelques sources d'eau minérale, celles de Karlsbad par exemple. En appliquant une méthode, dont nous avons M. BERTRAND et moi indiqué le principe, au cas particulier de sa recherche biologique, j'ai pu le caractériser et le doser dans une cinquantaine de plantes appartenant à des familles diverses et prélevées sur des terrains géologiquement et chimiquement distincts. J'ai pu incidemment noter son abondance particulière dans les plantes de la famille des Conifères.

De son action sur les végétaux, on savait peu de chose. RAULIN l'avait donné comme utile au développement de l'*Aspergillus niger*, mais les résultats de ce savant étaient contredits. J'ai repris cette étude et j'ai montré quelles doses infinitésimales exercent une action favorable sur cette Mucédinée. Ce n'est pas un fait sans intérêt biologique que de voir la prospérité d'une culture dépendre de la présence de 1/10.000.000 d'un élément chimique. J'ai essayé de préciser les relations de l'*Aspergillus* avec le zinc et de définir les doses nécessaires et les doses toxiques avec leurs intermédiaires.

Une levure de vin vivant facilement en voile à la surface de ses milieux s'est comportée, vis-à-vis du zinc, tout à fait comme l'*Aspergillus*. Je crois utile de souligner ce fait que l'action du zinc s'est manifestée à son plus haut degré pour deux organismes vivant d'une vie essentiellement aérobie. On fera bien de ne pas l'oublier quand on

voudra aller plus loin et chercher le pourquoi d'une action si singulière.

Sur la levure-ferment, les petites doses de zinc se sont montrées sans action manifeste.

Ces faits ne sont pas sans portée pratique. Le fabricant de levure et le fabricant d'alcool ont des intérêts dissemblables, puisque le premier cherche à produire le plus possible de levure avec une dépense aussi petite que possible en sucre, et le second le plus possible d'alcool avec le moins possible de levure, c'est-à-dire avec le moins de sucre inutilement consommé. Le premier cultive la levure-végétal ; l'autre, la levure-ferment. Le premier aura peut-être intérêt à retenir la notion acquise ; c'est au point de vue application une question à reprendre.

Les plantes vertes elles-mêmes, ou tout au moins le blé que j'ai le plus minutieusement observé, bénéficient de l'influence du zinc employé à dose modérée. Est-ce forcer les rapprochements que d'observer que, dans cette plante, ce sont les organes verts, les organes de respiration qui bénéficient de cette action, comme en bénéficiait notre levure aérobie, tandis que les racines sont presque, dès le début, lésées. Celles-ci deviennent plus grêles et diminuent leur appareil conducteur. Ceci doit rendre très circonspect dans les applications agricoles du zinc. J'ai commencé l'étude de ces applications : elles demandent à être poursuivies d'une façon méthodique.

Ces conclusions ont mis en vedette, avec les faits acquis, l'effort fait pour les asseoir sur de bonnes techniques expérimentales. Si ce travail a résolu quelques questions, peut-être en a-t-il posé davantage. C'est le cas de tout sujet fertile en aperçus.

En orientant leurs efforts vers l'étude des actions catalytiques, les biologistes feront, sans nul doute, une ample moisson de faits.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

PHYSIOLOGIE.....	Digestion des Trioses.
BOTANIQUE	Action de la lumière sur la morpho- logie des plantes supérieures.

Vu et approuvé

Paris, le 13 juin 1908.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

PAUL APPELL.

Vu et permis d'imprimer :

Paris, le 13 juin 1908.

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

L. LIARD.

